



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DIVERSIDAD GENÉTICA ENTRE LAS POBLACIONES DEL CONEJO  
ZACATUCHE (*Romerolagus diazi*)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JUAN PABLO RAMÍREZ SILVA

DIRECTOR DE TESIS: DR. FERNANDO ALFREDO CERVANTES REZA

MÉXICO, D.F.

ENERO 2009

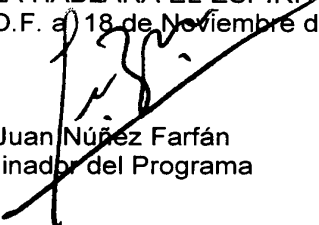
**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de Noviembre de 2007, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **JUAN PABLO RAMÍREZ SILVA** con número de cuenta **94619182** con la tesis titulada: "**DIVERSIDAD GENÉTICA ENTRE LAS POBLACIONES DEL CONEJO ZACATUCHE (*Romerolagus diazi*)**", realizada bajo la dirección del **DR. FERNANDO ALFREDO CERVANTES REZA**:

Presidente:	DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS
Vocal:	DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ
Vocal:	DR. ENRIQUE MARTÍNEZ MEYER
Vocal:	DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
Secretario:	DR. FERNANDO ALFREDO CERVANTES REZA
Suplente:	DR. ALEJANDRO VELÁZQUEZ MONTES
Suplente:	DR. ROBERTO CORIA ORTEGA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a 18 de Noviembre de 2008.

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

## Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, en particular al Instituto de Biología y a la Colección Nacional de Mamíferos.

A la DGEP y al Conacyt (No. 153852), por su apoyo económico para realizar mis estudios del posgrado.

A mi tutor, Dr. Fernando Cervantes Reza, por todo su apoyo, sus conocimientos y sobre todo sus consejos que me han permitido crecer académicamente.

Gracias al Dr. Luis Eguiarte Fruns y al Dr. Roberto Coria Ortega, quienes formaron parte de mi comité tutorial. Al Dr. Enrique Martínez Meyer, Alejandro Velázquez Montes, Dr. Adolfo Navarro Singüenza, por sus excelentes observaciones y la Dra. Ella Vázquez Domínguez, por su apoyo y enseñanzas. Así mismo agradezco al Dr. Francisco González Coatzl, por su apoyo con el trabajo del laboratorio y en la publicación del artículo. Todos ellos son para mí, un ejemplo a seguir.

Agradezco de manera muy especial a la Dra. Tila María Pérez Ortiz, por su confianza y brindarme la oportunidad de participar en el Comité de Posgrado, una experiencia que sin duda me permitió aprender mucho de ella.

A mis compañeros del Laboratorio de Mastozoología, especialmente a la M. en C. Yolanda Hortelano Moncada y a la M. en C. Julieta Varga Cuenca, que junto con todos los alumnos, contribuyen de manera muy importante en el conocimiento de los mamíferos de México.

Al M. en C. Francisco J. Romero Malpica, de quien he aprendido entre muchas cosas, el enorme compromiso por la conservación de los lagomorfos mexicanos, gracias por tu amistad, apoyo y enseñanzas.

A mis compañeros de AMCELA, especialmente Héctor Rangel, Adriana Romero y Patricia Rangel, por su convivencia y trabajo.

Gracias al M. en C. Omar Wicab Gutiérrez, Rector de la Universidad Autónoma de Nayarit, por brindarme para formar parte de esta distinguida casa de estudios y por su confianza al ponerme al frente de la Coordinación de la carrera de Biología. Gracias a la M. en C. Rosa Esthela González Flores, por su apoyo y su amistad, mismas que me ha permitido crecer en mi desarrollo profesional. Al Dr. Rubén Pérez González, Director de la Unidad Académica de Agricultura de la UAN, por permitirme colaborar en su administración y con ello tener la gran oportunidad de aprender de su experiencia. Gracias a mis compañeros Dr. Irán Bojorquez Serrano, Dr. Alberto Madueño Molina, Marisol Del Toro Romo, Ana María Hanan Alipi y Tamara Bernal Jaspeado y a mis alumnos por alentarme a la realización de este documento.

Gracias a mis Padres Isabel Silva Correa y Alberto Ramírez Zaragoza, por su cariño y enorme apoyo, gracias por su paciencia y sobre todo por sus ejemplo, que me ha

alentado a continuar con mis estudios. Gracias a mis Hermanos, Alberto Ramírez Silva, por su apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida, a Anabel Sierra Rodríguez y José Luis Camacho Espinosa, Gloria Edith Sierra Rodríguez y Raúl Sánchez Gómez y a Jessica Berenice Sierra Rodríguez por todo su ánimo para seguir adelante. A mis suegros Guadalupe Rodríguez Gutiérrez y Jesús Sierra de la Rosa, por sus consejos y ayuda para continuar.

A mi Familia, mi esposa Ivette Sierra Rodríguez, por su amor, comprensión, apoyo y enorme paciencia, por caminar juntos y crecer cada día. A mis hijas Paulette Iré y Vania Lucero por ser mi inspiración y la razón de luchar a cada instante. Gracias porque juntos hemos encontrado una vida llena de hermosas experiencias y un amor que no sabía que existían.

Gracias a Hugo, por darme la mano y ayudarme a evolucionar. Gracias a todos los seres que hicieron posible que llegara este proyecto.

## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
INTRODUCCIÓN	1
LITERATURA CITADA	3
MOLECULAR PHYLOGENY OF LEPUS (MAMMALIA: LAGOMORPHA): A PHYLOGENETIC ASSESSMENT INCLUDING ALL THE MEXICAN SPECIES	4
INTRODUCTION	7
MATERIAL AND METHODS	10
RESULTS	12
DISCUSSION	14
ACKNOWLEDGMENTS	21
LITERATURE CITED	21
DIVERSIDAD GENÉTICA ENTRE LAS POBLACIONES DEL CONEJO ZACATUCHE (ROMEROLAGUS DIAZI)	35
RESÚMEN	35
ABSTRACT	36
INTRODUCCIÓN	37
MATERIAL Y MÉTODOS	40
COLECTA DE MUESTRAS	40
EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE ADN	41
ANÁLISIS FILOGENÉTICO	41
DIVERSIDAD GENÉTICA	42
RESULTADOS	43
ANÁLISIS FILOGENÉTICO	43
DIVERSIDAD GENÉTICA	44
DISCUSIÓN	47
ANÁLISIS FILOGENÉTICO	47
DIVERSIDAD GENÉTICA	48
REFERENCIAS	51
CONCLUSIONES GENERALES	66

## INTRODUCCIÓN

México ocupa un lugar privilegiado debido a la gran cantidad de lagomorfos que habitan en su territorio, pues en él coexisten tres géneros: *Lepus*, *Sylvilagus* y *Romerolagus*, todos agrupados en la familia Leporidae, sumando un total de 15 especies, diez de ellas conejos y cinco de liebres; siendo el país con mayor diversidad de lepóridos a nivel mundial, aproximadamente el 23% a nivel mundial (Chapman y Flux, 1990).

El conocimiento sobre las relaciones filogenéticas de los lagomorfos, ha tenido sustento principalmente en los caracteres morfológicos (Corbet, 1983), los cuales no han logrado resolver satisfactoriamente las relaciones evolutivas en este grupo, debido a la escasa variación morfológica que presenta. Recientemente este aspecto ha sido fortalecido con algunos estudios basados en caracteres genéticos, los cuales han revelado mayor información (Robinson *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 2002) aunque desafortunadamente, a excepción de *Romerolagus*, estos estudios no involucran a las especies mexicanas, tanto especies endémicas como linajes de especies que habitan en México, por lo que el conocimiento sobre los acontecimientos históricos que han moldeado la evolución de los lepóridos en México es aún desconocido.

En cuanto a la información evolutiva generada para el conejo zacatucho, se sabe que esta especie ha sido relacionada evolutivamente con el conejo de Amami

(*Pentalagus furnessi*) y con el conejo de las rocas rojas (*Pronolagus rupestris*), que en conjunto constituyen el grupo de lepóridos más antiguos que viven en la actualidad y denominado Paleolaginae, aunque no conforman un grupo monofilético (Cobert, 1983).

Sin duda la información generada hasta el momento ha sido de gran importancia para comprender como ha ocurrido la evolución de este importante grupo, sin embargo, es de gran trascendencia conocer la información contenida en especies mexicanas, ya que México es uno de los países con mayor diversidad de lepóridos y si se desconoce la evolución de los linajes mexicanos, se desconoce gran parte de la historia de este grupo, información de gran trascendencia para elaborar estrategias de conservación (Frankham, 2005). El presente trabajo esta dividido en dos secciones, la primera de ellas se enfoca al análisis de las especies de liebres mexicanas (*Lepus*), en un contexto mundial, analizando la información genética de todas las especies presentes en territorio mexicano y realizando un muestreo bastante completo de las especies que existen a nivel mundial. Por otro lado la segunda parte del documento, se enfoca al análisis de los consecuencias genéticas debidas a la fragmentación del hábitat del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*), especialmente en la zona de la Sierra del Ajusco y Chichinautzin. En ambos casos se discuten las implicaciones de los resultados encontrados en la conservación de los taxones.

## **Literatura Citada**

Chapman, J. A. and J. E. C. Flux. (Eds). 1990. Rabbits, hares and pikas, status survey and conservation action plan. IUCN, Gland, Switzerland. 168 p.

Corbet, G. B. 1983. A review of the classification in the family Leporidae. Acta Zoologica Fennica 174:11-15.

Robinson, T. J. 1999. Comparative chromosome studies in the family Leporidae (Lagomorpha: Mammalia). Cytogenetics and Cell Genetics 28:64-70.

Yamada, F., M. Takaki, and H. Suzuki. 2002. Molecular phylogeny of Japanese Leporidae, the Amami rabbit *Pentalagus furnesi*, the Japanese hare *Lepus brachiurus*, and the mountain hare *Lepus timidus*, inferred from mitochondrial DNA sequences. Genes and Genetic Systems 77:107-116.

Frankham R., J.D. Ballou, y D.A. Briscoe. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge, Reino Unido.



## Molecular phylogeny of *Lepus* (Mammalia: Lagomorpha): a phylogenetic assessment including all the Mexican species

5    Ramírez-Silva<sup>1\*</sup>, J. P., F. X. González-Cózat<sup>2</sup>, E. Vázquez-Domínguez<sup>3</sup> and F. A. Cervantes<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> *Programa de Biología, Universidad Autónoma de Nayarit, Ciudad de la Cultura “Amado Nervo”. Tepic, Nayarit 63155, México.*

<sup>2</sup> Centro de Educación Ambiental e Investigación Sierra de Huautla, UAEM, Av.  
10    Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62210, México.

<sup>3</sup> *Departamento de Ecología de la Biodiversidad, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70-275, Ciudad Universitaria, México, DF., 04510, México.*

<sup>4</sup> *Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de  
15    México, Ap. Postal 70-153, México, DF, 04510, México.*

\* Correspondencia: [pablor@nayar.uan.mx](mailto:pablor@nayar.uan.mx)

**Abstract.** *Lepus* is the most diverse genus within the family Leporidae (Lagomorpha),  
20 with a worldwide distribution. The objective of this study was to evaluate the  
phylogenetic relationships and origin of hares and jackrabbits from the genus *Lepus*,  
and particularly in the Mexican species. We analyzed 51 complete cytochrome b  
sequences belonging to 23 *Lepus* species distributed across Asia, Africa, Europe and  
America. We performed phylogenetic tree reconstruction with Neighbor-joining,  
25 Maximum Parsimony and Maximum Likelihood. We also evaluated the genetic structure  
via nucleotide divergence and genetic distance and, for the Mexican species, a minimum  
spanning network and a Mantel test were done. We found five main phylogenetic groups  
that corresponded well with the geographical distribution of the species; one group  
included the American species, three other corresponded to Mexican, African and  
30 European species, and a last one grouped Asiatic and Arctic species. Our study  
represents one of the most complete sampling of *Lepus*, in terms of number of species  
and geographical scope. We confirmed that the most plausible origin of *Lepus* was from  
North America (*Lepus americanus*). The Mexican species formed a monophyletic group,  
which showed geographical structuring and a rather high genetic differentiation.

35

Key words: Cytochrome b, hares, jackrabbits, Mexico, mitochondrial DNA,  
phylogeography

**Resumen.** *Lepus* es el género más diverso dentro de la familia Leporidae (Lagomorpha), con una distribución mundial. El objetivo del presente estudio fue evaluar las relaciones filogenéticas y el origen de las liebres del género *Lepus*, y en particular en las especies mexicanas. Se analizaron 51 secuencias completas del citocromo b pertenecientes a 23 especies de *Lepus* distribuidas en Asia, África, Europa y América. Se realizó la reconstrucción filogenética mediante Neighbor-joining, Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud. Para evaluar la estructura genética estimamos divergencia nucleotídica y distancia genética y, para las especies mexicanas, realizamos una red mínima y una prueba de Mantel. Observamos cinco grupos filogenéticos principales que correspondieron con la distribución geográfica: un grupo incluyó las especies Americanas, otros tres a las Mexicanas, Africanas y Europeas, y uno más agrupó a las especies Asiáticas y del Ártico. Este trabajo representa uno de los muestreos más completos de *Lepus*, en términos del número de especies y del alcance geográfico. Se confirmó que el origen más plausible de *Lepus* está en Norteamérica (*Lepus americanus*). Las especies mexicanas constituyeron un grupo monofilético, el cual mostró una clara estructuración geográfica y una diferenciación genética significativamente alta.

Palabras clave: ADN mitocondrial, Citocromo b, filogeografía, liebres, México

## **Introduction**

60

The family Leporidae (hares, jackrabbits and rabbits), which includes 11 extant genera and approximately 56 species, is a successful group with a worldwide distribution, originally absent only from Australia and southern South America, West Indies, Madagascar and some Ethiopian islands, in many of which they have recently  
65 been introduced (Robinson, 1980; Chapman and Flux, 1990). Because of the intricate relationship of many leporid species with different ecosystems, as well as the commercial importance of game species, they have been the focus of ecological, genetic, and taxonomic studies (Corbet, 1978, 1983; Chapman and Flux, 1990; Halanych and Robinson, 1997, 1999). However, little is known about the evolutionary  
70 history of the family (Halanych *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2005).

The genus *Lepus* is the most diverse within the family Leporidae, with 32 formerly recognized species, and only followed by *Sylvilagus* and *Pronolagus* with 17 and three species, respectively (Hoffman and Smith, 2005). Despite being species-rich, this group shows little morphological variation, which has in turn make it difficult to define the  
75 taxonomic status of some of its species, as well as reconstructing their genealogical relationships.

Four decades ago and based on the fossil record, Hibbard (1963) proposed that the genus *Lepus* appeared first in North America, from where it later radiated to the rest of the world. Halanych *et al.* (1999) provided a more comprehensive study of the  
80 phylogenetic relationships of *Lepus*, including 11 species and using partial sequences of cytochrome b. They were unable, however, to confirm or refute the American origin of *Lepus*, given the narrow biogeographic representation of species in their study

(Halanych *et al.*, 1999). In a recent phylogenetic study of *Lepus* also using partial cytochrome b sequences, Yamada *et al.* (2002) show the existence of two main clades, an American one (USA and Mexico) separated from another clade comprising African, European and Japanese species. They did not discuss the origin of *Lepus*. In the latest studies about the phylogeny of the family Leporidae, Matthee *et al.* (2004) suggest an Asian or North America origin of the leporids, followed by several dispersal and vicariance events, and Wu *et al.* (2005) assert that an ancestral *Lepus* arose in North America.

Most studies of species in the genus *Lepus* have been focused in phylogeny in order to examine taxonomic relationships, while the genealogical and biogeographical patterns of *Lepus* have been scarcely, and only recently, being reviewed, with emphasis in some particular groups of species; Pierpaoli *et al.* (1999) worked with *Lepus corsicanus* and Yamada *et al.* (2002) studied the biogeography of some Japanese species. Phylogeographical analyses have been done for *Lepus europaeus* (Kasapidis *et al.*, 2005), arctic hares (Waltari *et al.*, 2004) and a study including most species in the genus, with emphasis in species from Eastern Asia (Wu *et al.*, 2005).

Five *Lepus* species inhabit in Mexico. One, *L. californicus*, displays a wide distribution from southwestern United States (USA) to northcentral Mexico. Two other species have most of their distribution in Mexico, but they extend a little further north: *L. alleni* that goes from central-south Arizona (USA) to the complete north coast of the Mexican Pacific, and *L. callotis*, with a population in southern New Mexico (USA), but with its maximum distribution in Mexico, from the north across the Sierra Madre Occidental to the center of the country. On the other hand, *L. flavigularis* and *L. insularis* are endemic species of Mexico, distributed in a small tropical region of the Isthmus of

Tehuantepec in the state of Oaxaca and in the Espiritu Santo island, Baja California Sur, respectively.

110 These five species with all or most of their geographical range in Mexico, represent the southernmost distribution of the genus and also represent the highest species rich group of leporids in the continent. However, to our knowledge no studies have been done that include the five species in a phylogenetic analysis. This is important because, although the latest studies support the possible origin of *Lepus* in North America, the phylogenetic relations of the American *Lepus* species are uncertain. Moreover, 115 considering that the species studied in previous works correspond to a poliphyletic group, the inclusion of the Mexican species may further refine the leporid evolutionary history.

Historical geographic processes (e.g., long-distance dispersal, range expansion) produce specific patterns in the spatial distribution of alleles, and combining molecular 120 and geographical information has been one form of deciphering such historical patterns in different animal taxa, mainly using mitochondrial DNA, and with particular emphasis in the use of the cytochrome b (Avise *et al.*, 1998; Avise, 2000; Vázquez-Domínguez, 2002).

Our objective in the present study was to assess the phylogenetic relationships of 125 the genus *Lepus*, to elucidate those of the Mexican species, and to estimate the origin of the genus. Our aim was also that with the inclusion of the Mexican species we could describe the geographical and evolutionary history of the leporids, especially in the American continent, allowing us to support the most plausible hypothesis on the origin of *Lepus*. Previous *Lepus* phylogenetic studies included partial sequences and less

130 species, thus we sequenced the complete cytochrome b and included species  
encompassing the complete geographical range distribution of the genus.

## **Material and Methods**

135 Complete cytochrome b (cyt b) gene sequences (1140 bp) of 51 individuals  
representing 23 species of *Lepus* were analyzed. Twenty-three *Lepus* sequences were  
obtained from the DDBJ/EMBL/GenBank International Nucleotide Sequence Databases  
and the remaining 28 were from González-Cózatl (2000) (Table 1). In addition, four  
sequences were used as outgroups from *Oryctolagus*, *Sylvilagus*, *Romerolagus*  
140 (*González-Cózatl*, 2000) and *Pentalagus* (GenBank).

For the phylogenetic analyses, the alignment of sequences was performed with the  
multiple alignment program Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) and corrected by hand for  
obvious alignment errors. Assessment of sequence composition was done in order to  
evaluate the frequencies for variable and parsimonious informative sites in the first,  
145 second and third codon positions, with the DNAsp program (Rozas and Rozas, 1999).  
This analysis was done with and without the outgroup. The best-fit model of evolution  
was identified based on the hierarchical likelihood-ratio test under the Akaike Information  
Criterion implemented in Modeltest 3.06 (Posada and Crandall, 1998).

Phylogenetic tree reconstruction was done with the PAUP\* software package  
150 (version 4.0 beta; Swofford, 2002), using the neighbor-joining (NJ) and maximum-  
parsimony (MP) procedures; maximum-likelihood (ML) was performed using the  
program PHYML (Guindon and Gascuel, 2003). The optimal distance model identified  
by Modeltest was used to estimate a phylogeny with NJ and ML. Based on previous

*Lepus* studies with cyt b (Halanych *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 2002) and in order to  
155 facilitate comparisons among studies, we also performed NJ and ML analysis using  
Kimura's (1980) two-parameter model (K2P), with a  $\gamma$  correction ( $\alpha= 0.5$ ) and applying  
equal weights for all positions (in the codon) and all substitution types. The latter is also  
based in previous studies, where the same topology has been recovered for *Lepus*  
phylogenies when using equal weighting as when constructed with different weighting  
160 schemes (Halanych *et al.*, 1999; Matthee *et al.*, 2004). MP analyses were based on  
heuristic searches with 10 random additions and implementing the tree bisection-  
reconnection (TBR) algorithm and ML were based in the algorithm of Guindon and  
Gascuel (2003). A consensus tree was estimated using the majority consensus method  
(allowing clades with less than 50% agreement). Confidence in resulting nodes was  
165 assessed using the bootstrap approach (Felsenstein, 1985) with 1000 replicates for NJ,  
MP and 500 for ML, the latter because of computational time constraints.

To assess genetic structure, net nucleotide divergence (*Da*) (Nei, 1987) was  
estimated between the different groups observed in the resulting phylogenetic tree (see  
Results), with the Jukes and Cantor correction using the DNAsp program. Genetic  
170 distances were also estimated in order to do pairwise comparisons among the groups  
found, with the Kimura two-parameter method and using the MEGA 3.0 software (Kumar  
*et al.*, 2004) . Standard errors were estimated by the bootstrap method with 10 000  
replicates.

Finally, we evaluated the five species with distribution in Mexico using a total of  
175 19 sequences (seven sequences more than in the phylogenetic analysis) by doing a  
minimum spanning network (MSN), which illustrates the minimum number of mutational



steps between haplotypes of the species, constructed using TCS 1.20 (Clement et al., 2000). Also, a Mantel test was used to measure the correlation between the individuals pairwise geographical distances (km) with the individuals pairwise genetic distances, using ARLEQUIN 2.0 (Schneider et al., 2000).

## **Results**

### 185 Phylogenetic analyses

Of the 1140 base pairs examined using all cyt b sequences, 497 were variable sites (43.6%), and 393 (34.5%) were informative sites. The majority of the variable sites (90%) occurred at the third codon position, while most of the informative sites (79.7%) also occurred at the third position. The same proportion of variable and informative sites, as well as those at the third position, are observed when the species used as outgroup are excluded from the analysis.

The General Time Reversible model (GTR; Rodríguez *et al.*, 1990) of DNA substitution was selected as the most appropriate for our data (base frequencies A = 0.2899, C = 0.3309, G = 0.1160, T = 0.2676, proportion of invariant sites I = 0.4978, and shape parameter  $\alpha = 1.0920$ ). NJ and ML reconstruction methods recovered each the same topology whether constructed with the K2P or the GTR models; very similar trees were obtained with all methods, ML, NJ and MP, with only minor topological differences within groups. Accordingly, results are described based on the phylogenetic topology depicted with ML constructed with the GTR model (Fig. 1) and the consensus MP (Fig.

2), which showed five main groups. The parsimony searches generated 88 most parsimonious trees, with length (L = 1980), consistency index (CI = 0.354) and retention index (RI = 0.681).

The five groups found evidenced the different geographical distributions of the species (Figs. 1, 3): group A corresponded to species of *Lepus americanus*, a clade located at the root of the tree, with moderate bootstrap values (NJ and MP), and sister to all other groups. The next, group B included the “Mexican” species (*L. californicus*, *L. insularis*, *L. alleni*, *L. flavigularis* and *L. callotis*). Next were the sequences for group C and D, with two exclusively African species, *L. capensis* and *L. saxatilis* and two exclusively European ones, *L. europaeus* and *L. granatensis*, respectively. Finally, group E encompassed most of the sequences found in Asia, mainly China, but including Japan, with species like *L. capensis*, *L. sinensis*, *L. comus*, *L. oiostolus*, *L. brachyurus*, and *L. timidus*; it also grouped the Arctic species that noticeably display shorter branches, conformed by species with a continuous circumpolar distribution (Asia and North America), such as *L. othus*, *L. timidus*, *L. townsendii*, *L. arcticus*, and *L. mandshuricus* (Fig. 1).

### Genetic structure

The genetic distances estimated among groups varied from 10.8% between groups B and D, to the most distant values between group A and both C and E groups, 13.8 and 13.6%, respectively (Table 2). Values were also high between groups A and D, and between E and C (12.7 and 13.1 %, respectively). Similarly, high nucleotide divergence values were observed between group A and group B, C and D (5.6-6.0%); noticeably,

225 the highest value occurred between groups B and D (6.4%) that had the lowest genetic distance. The lowest divergence value (4.3%) was between group E and both C and D (Table 3).

The minimum spanning network among the Mexican species showed high haplotype differentiation among species, in which two main groups were formed (Fig. 3). One group comprised all *L. californicus* and *L. insularis* sequences (with the exception of one *L. californicus*) with separation between both species ranging from five to sixteen mutational steps. *L. alleni* and *L. callotis* formed the other group, where *L. alleni* haplotypes are separated from the latter species by eight mutational steps, while those of *L. callotis* are close together (Fig. 3). *L. flavigularis* and one sample of *L. californicus* were left out of the network, which indicates that they represent even greater genetic separations (more than sixteen mutational steps). Results of the Mantel test were significant ( $r = 0.360$ ,  $P = 0.02$ ).

## **Discussion**

240

### Phylogenetic analysis

We examined 51 individuals from 23 species of *Lepus*, using complete cyt b gene sequences (1140 bp). This represents a considerably comprehensive sampling of *Lepus*, in terms of number of species, geographical extent, and sequence size, though it unfortunately excludes a few species, mainly from Africa and Europe (e.g., *L. castroviejoi*, *L. corsicanus*, *L. habessinicus*, *L. fagani*, *L. microtis*, *L. nigricollis*, *L. peguensis*, *L. tibetanus* and *L. victoriae*), for which no complete cyt b sequences could

be obtained. The sequence variation observed for *Lepus* displays the typical variability  
250 proportion found in other mammals, although the percentage of variable and informative  
sites showed a marked increase with respect to values previously reported for leporids  
(Halanych and Robinson, 1999) and *Lepus* (Halanych *et al.*, 1999), which probably  
results from our data being from the complete and not partial *cyt b* sequence.

The five groups (phylogenetic clades) shown in our results corresponded well  
255 with the geographical distribution of species (Fig. 1). Monophyletic clades of African and  
European hare species have been documented before (Alves *et al.*, 2003). Halanych *et al.*  
(1999) found as well what they called a western American clade, which included *L.*  
*americanus*, *L. callotis*, *L. californicus*, and *L. alleni*, while Wu *et al.* (2005) grouped the  
same four species as their North American clade. Our results are in accordance with  
260 their findings, as we show that *L. americanus* is the most basal species, a group that  
also showed the greatest genetic distance.

In a recent study of the family Leporidae, Matthee *et al.* (2004) show that the  
evolutionary relationships among six *Lepus* species was effectively resolved with mtDNA  
and considerably similar to that obtained with a supermatrix (nuclear and mitochondrial  
265 genes). Our findings are in agreement with their results, which show *L. americanus* as  
the most basal *Lepus* species, as well as the *Lepus* species with Arctic distribution as  
the more recently diversified. Wu *et al.* (2005) report very similar results. Additionally, in  
their study of North American jackrabbits using different phylogenetic analyses,  
Halanych *et al.* (1999) consistently recovered an Arctic clade encompassing *L. othus*, *L.*  
270 *arcticus*, *L. timidus*, and which included *L. townsendii*, a species found in North America.  
Our inclusion of the Asiatic *L. timidus*, as well *L. townsendii* within the same group, is

also congruent with the phylogeographic results found in the latest study of arctic hare species (Waltari *et al.*, 2004).

No prior study had included all species that occur in Mexico. In the present  
275 analysis these species were consistently recovered as a monophyletic clade (group B),  
with strong nodal support. Our results suggest a rapid radiation of the lineages in the  
Mexican group, in which *L. flavigularis*, *L. alleni* and *L. callotis* diverged earlier and as  
separate lineages from the rest of the species. The American species (group A) had the  
highest nucleotide divergence with the Mexican species (included in group B), which  
280 supports the separation, into two lineages, of *L. americanus* and the species in the  
Mexican group (Table 3). Our results also show that the Mexican species conform the  
only monophyletic group in the American Continent, with older lineages than most *Lepus*  
species (i.e., basal in the phylogenetic tree), with the exception of *L. americanus*, and  
presumably sharing a common ancestor with all others *Lepus* species in the world.  
285 However, an analysis including more localities and undoubtedly more genes (nuclear  
and mitochondrial) are needed to complete the evolutionary history of *Lepus*.

#### Thoughts on the origin of *Lepus*

290 Our analyses agreed with the earliest hypothesis that suggests an American origin of  
*Lepus* around the beginning of the Pliocene (Hibbard, 1963), and the more recent one of  
Wu *et al.* (2005) of an American origin, in which hares radiated to other continents from  
North America. It has been estimated that *Lepus* radiated approximately 4-5 million  
years ago (Mya; Yamada *et al.*, 2002; Matthee *et al.*, 2004). The evolutionary history of  
295 the family Leporidae has been shaped by several dispersal and vicariant events since

the Miocene until recently in geological history. During the Middle Miocene (ca. 15 Mya), one leporid lineage established in North America; this ancestor gave rise to two lineages which diverged to form *Romerolagus* as one group, and the other lineage conformed by *Lepus* jointly with some other genera (Matthee *et al.*, 2004). In particular, the Bering Strait region was a land bridge between North America and Asia for most of the Cenozoic Era, which opened about 5.3-3.5 Mya (Marincovich and Gladenkov, 1999). This was followed by several Northern Hemisphere glaciations that started around 2-3 Mya, with periodic fluctuations in sea level, intermittently allowing or forming barriers to the dispersal of flora and fauna (Hewitt, 2004).

The relationship of the snowshoe hare, *L. americanus*, to other *Lepus* has been controversial. This small species, adapted to life in or near boreal forests, was considered to be morphologically more similar to members of the genus *Sylvilagus* than to members of its own genus (White & Keller, 1984). Further, it was suggested that *L. americanus* could be distantly related to other hares and jackrabbits and may warrant a separate generic designation (Flux, 1983). However, recent studies have indicated that this species is correctly classified as a hare (Halanych *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 2002; Matthee *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2005). The results obtained in this study also are in agreement with the recognition of *L. americanus* as a member of the genus *Lepus*. Nevertheless, all analyses consistently recovered *L. americanus* as the most basal clade within all hares and jackrabbits, suggesting that this species represents an old lineage within *Lepus*.

Halanych *et al.* (1999) were not able to confirm or refute that *Lepus* first arose in America, recognizing their incomplete representation of species from Asia, Europe, Africa and Mexico. We, including a greater scope of species, were able to better resolve

320 the evolution of *Lepus*, showing the subdivision into highly distinctive groups, in which *L.*  
*americanus* represents the earliest offshoot group located in the basal region of the  
topology. This confirms Wu's conclusion that *Lepus* first arose in North America (Wu *et*  
*al.*, 2005).

325 The Mexican species

Given that we analyzed only a few samples for the Mexican species, we recognize  
that our interpretations should be taken cautiously. The minimum spanning network  
results and the significant correlation between genetic and geographical distances  
330 demonstrated that the Mexican species are highly differentiated, both between and  
within species. The phylogenetic results suggested that *L. flavigularis*, *L. alleni* and *L.*  
*callotis* diverged earlier and as separate lineages from the rest of the species.  
Interestingly, those results agree with the minimum spanning network groups observed, .  
given that one group is formed by all the sequences from *L. alleni* and *L. callotis* –and in  
335 which *L. flavigularis* is even more differentiated. The other group includes de haplotypes  
from *L. californicus* and *L. insularis*, also more closely related in the phylogenetic tree.

All *L. californicus* haplotypes are greatly separated; particularly, the haplotype from  
USA is separated by several mutational steps from *L. californicus* from northern Mexico  
and even further from the haplotype from central Mexico. The two haplotypes of *L.*  
340 *insularis*, a species endemic to a southern Californian island, Espiritu Santo, are both  
closer to one haplotype of *L. californicus* from Baja California Sur than to any other in  
the network (Fig. 3)

*L. callotis*, *L. alleni* (northern Mexico) and the other endemic species *L. flavigularis* (the species with the most southern distribution) represent a great genetic separation –  
345 as a separated group–, which can also be appreciated in the phylogenetic tree. These results suggest that populations, and not only species, are highly differentiated, especially those species with broader distributions like *L. californicus*, which showed a strong geographical structure. *L. callotis* from central Mexico is also separated by several steps from the haplotype located in northern Mexico.

350 The particular relationship between *L. insularis* and *L. californicus* was supported by bootstrap proportions over 72%. This is in agreement with the analysis by Dixon *et al.* (1983) suggesting a close affinity between these two species. Results also indicated that *L. californicus* is paraphyletic relative to *L. insularis*. All our analyses demonstrated that some haplotypes of *L. californicus* are more closely related to *L. insularis* than to other  
355 haplotypes of *L. californicus*.

Although *L. insularis* is recognized as a distinct species from *L. californicus* based on an analysis of cranial features (Dixon *et al.*, 1983), its species-level status has been questioned (Chapman *et al.*, 1983; Flux, 1983). *L. californicus* has the most widespread distribution of the five species, while *L. insularis* occurs exclusively in Espiritu Santo, an  
360 island of volcanic origin in the Gulf of California that has been present for only 5,000 - 12,000 years (Faeth & Connor, 1979). It is thought that this species is derived from a population of *L. californicus* of the nearby peninsula of Baja California (Thomas & Best, 1994). The greater similarity between their haplotypes compared to that between conspecific individuals in *L. californicus* can be explained by the retention of ancestral  
365 polymorphism in *L. californicus*, leading to differential lineage sorting of alternative haplotypes (Neigel & Avise, 1986; Pamilo & Nei, 1988). This phenomenon has also



been proposed to occur with *L. europaeus*, *L. granatensis* and *L. castroviejo* in Spain (Pérez-390 Suárez et al., 1994). On the other hand, if the results obtained in this study actually reflect the species phylogeny, *L. insularis* would represent an isolated  
370 population of *L. californicus*. Clearly, a more detailed sampling and information from alternative markers are required to evaluate the specific status of *L. insularis* relative to *L. californicus*.

Inclusion of *L. alleni*, *L. callotis* and *L. flavigularis* in a separate group in our analyses is consistent with the view by Anderson and Gaunt (1962), who proposed a  
375 close relationship among these species based on morphological and distributional evidence and a common origin from an ancestral stock. These three species traditionally have been grouped as the “whitesided jack-rabbits” species group. However, nodal support for this grouping is relatively weak and these results are based on a few individuals. Further sampling will be required to refine relationships within this species  
380 group.

It is particularly important to mention that *L. californicus*, *L. insularis*, *L. alleni*, *L. flavigularis* and *L. callotis*, are all listed as endangered, vulnerable or needing special protection by the Mexican government and/or the IUCN (Hilton-Taylor, 2000; Semarnat, 2002), two of which are also endemic to Mexico (*L. flavigularis* and *L. insularis*). Given  
385 their conservation status and present preliminary genetic information, these species warrant further study regarding their ecology and population genetics. A complete phylogeographic study will help elucidate how the intricate geological and biogeographical history of Mexico has shaped the present distribution of these species; this will ultimately provide information for a thorough evaluation of those species facing  
390 conservation problems.

## **Acknowledgments**

We thank for helpful comments of two anonymous reviewers and A. Vázquez-Lobo for her kind assistance with endless phylogenetic analyses questions. E.V.D.

395 acknowledges support from the Instituto de Ecología. We are grateful to two anonymous reviewers for their comments that helped improve the manuscript. The first author had a scholarship from Conacyt (No 153852).

## **Literature cited**

400

Alves, P. C., N. Ferrand, F. Suchentrunk, and D. J. Harris, 2003. Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L. granatensis* and *L. europaeus* in the Iberian Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27:70-80.

Avice, J. C. 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 464 p.

405

Avice, J. C., D. Walker, and G. C. Johns. 1998. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society London series B* 265:1707-1712.

Austin, J. D., S. C. Loughheed, P. E. Moler, and P. T. Boag. 2003. Phylogenetics, zoogeography, and the role of dispersal and vicariance in the evolution of the *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae). species group. *Biological Journal of the Linnean Society* 80:601-624.

410

- Barnes, I., P. Matheus, B. Shapiro, D. Jensen, and A. Cooper. 2002. Dynamics of Pleistocene population extinctions in Beringian Brown bears. *Science* 295:2267-415 2270.
- Chapman, J. A. and J. E. C. Flux. (Eds). 1990. Rabbits, hares and pikas, status survey and conservation action plan. IUCN, Gland, Switzerland. 168 p.
- Cook, J. A., A. M. Runck, and C. J. Conroy. 2004. Historical biogeography at the crossroads of the northern continents: molecular phylogenetics of red-backed voles 420 (Rodentia: Arvicolinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30:767-777.
- Corbet, G. B. 1983. A review of the classification in the family Leporidae. *Acta Zoologica Fennica* 174:11-15.
- Demboski, J. R. and J. A. Cook. 2003. Phylogenetic diversification within the *Sorex cinereus* group Soricidae. *Journal of Mammalogy*, 84, 144-158.
- 425 Dixon, K. R., J. A. Chapman, G. R. Willner, D. E. Wilson, and W. López-Forment. 1983. The New World jackrabbits and hares genus *Lepus*. 2. Numerical taxonomic analysis. *Acta Zoologica Fennica* 174:53-56.
- Fedorov, V. and N. C. Stenseth. 2002. Multiple glacial refugia in the North American Arctic: inference from phylogeography of the collared lemming (*Dicrostonyx* 430 *groenlandicus*). *Proceedings of the Royal Society London series B* 269:2071-2077.
- Fleischer, R. C., E. A. Perry, K. Muralidharan, E. E. Stevens and C. M. Wemmer. 2001. Phylogeography of the Asian elephant (*Elephas maximus*). based on mitochondrial DNA. *Evolution* 55:1882-1892.
- Flux, J. E. C. and R. Angermann. 1990. The hares and jackrabbits. Rabbits, hares and 435 pikas, status survey and conservation action plan *In* Chapman J. A. and J. E. C. Flux. (eds.). IUCN, Gland, Switzerland. p. 61-94.

- González-Cózatl, F. 2000. Molecular Systematics of the Genus *Lepus* in North America (Mammalia: Lagomorpha). Ph. D. Thesis. Brigham Young University, USA. 69 p.
- Guindon, G. and O. Gascuel. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate  
440 large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52:696-704.
- Halanych, K. and T. J. Robinson. 1997. Phylogenetic relationships of cottontails  
*Sylvilagus* (Lagomorpha): congruence of 12S rDNA and cytogenetic data. *Molecular  
Phylogenetics and Evolution* 7:294-302.
- Halanych, K. and T. J. Robinson. 1999. Multiple substitutions affect the phylogenetic  
445 utility of cytochrome b and 12S rDNA data: examining a rapid radiation in Leporid  
(Lagomorpha) evolution. *Journal of Molecular Evolution* 48:369-379.
- Halanych, K., J. Dembosky, B. Van Vuuren, D. Klein and A. Cook. 1999. Cytochrome b  
phylogeny of North American hares and jackrabbits *Lepus* (Lagomorpha) and the  
effects of saturation in outgroup taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*  
450 11:213-221.
- Hewitt, G. M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary.  
*Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 359:183-195.
- Hibbard, C. 1963. The origin of the P3 pattern of *Sylvilagus*, *Caprolagus*, *Oryctolagus*  
and *Lepus*. *Journal of Mammalogy* 44:1-15.
- 455 Hilton-Taylor, C. 2000. IUCN Red List of Threatened Species. IUCN, Glanz, Switzerland.  
CD-ROM.
- Hoffmann, R. S. 1993. Order Lagomorpha. Mammal species of the world: a taxonomic  
and geographic reference *In* Wilson D. E. and D. M. Reeder. (eds) Smithsonian  
Institution Press, Washington, D. C. p. 807-827.

- 460 Kasapidis, P., F. Suchentrunk, A. Magoulas, and G. Kotoulas. 2005. The shaping of  
mitochondrial DNA phylogeographic patterns of the brown hare (*Lepus europaeus*)  
under the combined influence of Late Pleistocene climatic fluctuations and  
anthropogenic translocations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34:55-66.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions  
465 through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular*  
*Evolution* 16:111-120.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular  
evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*  
5:150-163.
- 470 Marinovich, J. L. and A. Y. Gladenkov. 1999. Evidence for an early opening of the  
Bering Strait. *Nature* 397:149-151.
- Martin, A. P. and S. R. Palumbi. 1993. Body size, metabolic rate, generation time and  
the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*,  
90:4087-4091.
- 475 Matthee, C. A., B. J. Van Vuren, D. Bell and T. J. Robinson. 2004. A molecular  
supermatrix of the rabbits and hares (Leporidae) allows for the identification of five  
intercontinental exchanges during the Miocene. *Systematic Biology* 53:433-447.
- Pierpaoli, M., F. Riga, V. Trocchi and E. Randi. 1999. Species distinction and  
evolutionary relationships of the italian hare (*Lepus corsicanus*) as described by  
480 mitochondrial DNA sequencing. *Molecular Ecology* 8:1805-1817.
- Posada, D. and K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution.  
*Bioinformatics*, 14, 817-818.

- Rausch, R. L. 1963. A review of the distribution of holarctic recent mammals. Pacific basin biogeography *In* Gressitt J. L. (ed.) Honolulu Bishop Museum Press, Hawaii.  
485 p. 29-43.
- Robinson, T. J. 1980. Comparative chromosome studies in the family Leporidae (Lagomorpha: Mammalia). *Cytogenetics and Cell Genetics* 28:64-70.
- Rodríguez, F., J. L. Oliver, A. Marín, and J. R. Medina. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* 142:485-501.
- 490 Rozas, J. and R. Rozas. 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetic and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15:174-175.
- Schneider, S., Roessli, L. & Excoffier, L. (2000) ARLEQUIN, A software for population genetics data analysis. Version 2.0. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- 495 Semarnat. (2002). NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental, especies nativas de México de flora y fauna silvestres - Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio - Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación marzo:1-85.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods.  
500 Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, K. and M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
- Vázquez-Domínguez, E. 2002. Phylogeography, historical patterns and conservation of  
505 natural areas. *In* Nelson, G., J. C. Day, L. M. Sportza, J. Loucky and C. Vázquez

(eds.). Protected Areas and the Regional Planning Imperative in North America.  
University of Calgary Press, Calgary. p. 369-378.

510 Waltari, E., R. Demboski, D. R. Klein, and J. A. Cook. 2004. A molecular perspective on  
the historical biogeography of the Northern high latitudes. *Journal of Mammalogy*  
85:591-600.

Wilson, D. E. and S. Ruff. 1999. *The Smithsonian book of North American mammals*.  
Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. 750 p.

515 Wu, C., J. Wu, T. D Bunch, Q, Li, Y. Wang and Y. Zhang. 2005. Molecular phylogenetics  
and biogeography of *Lepus* in Eastern Asia based on mitochondrial DNA  
sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37:45-61.

Yamada, F., M. Takaki, and H. Suzuki. 2002. Molecular phylogeny of Japanese  
Leporidae, the Amami rabbit *Pentalagus furnesi*, the Japanese hare *Lepus*  
*brachiurus*, and the mountain hare *Lepus timidus*, inferred from mitochondrial DNA  
sequences. *Genes and Genetic Systems* 77:107-116.

520

525

**Table 1.** Keys to the species, source and localities for the sequences (the source displays the accession numbers or the reference).

<b>Key</b>	<b>Source</b>	<b>Locality</b>	<b>Phylogenetic Group</b>
<i>L. alleni</i>	González-Cózatl (2000)	Mexico	B
<i>L. americanus 1</i>	González-Cózatl (2000)	Alaska, USA	A
<i>L. americanus 2</i>	González-Cózatl (2000)	Utah, USA	A
<i>L. americanus 3</i>	AY292733	USA	A
<i>L. arcticus</i>	González-Cózatl (2000)	Greenland	E
<i>L. brachyurus 1</i>	AB058615	Japan	E
<i>L. brachyurus 2</i>	AB058616	Japan	E
<i>L. californicus 1</i>	González-Cózatl (2000)	Mexico	B
<i>L. californicus 2</i>	González-Cózatl (2000)	Utah, USA	B
<i>L. californicus 3</i>	González-Cózatl (2000)	Mexico	B
<i>L. californicus 4</i>	González-Cózatl (2000)	Mexico	B
<i>L. californicus 5</i>	González-Cózatl (2000)	Mexico	B
<i>L. callotis</i>	González-Cózatl (2000)	Mexico	B
<i>L. callotis 2</i>	González-Cózatl (2000)	Mexico	B
<i>L. callotis 3</i>	González-Cózatl (2000)	Mexico	B
<i>L. capensis 1</i>	González-Cózatl (2000)	Africa	C
<i>L. capensis 2</i>	González-Cózatl (2000)	South Africa	C
<i>L. comus 1</i>	AJ279404	China	E
<i>L. comus 2</i>	AJ279406	China	E
<i>L. coreanus</i>	González-Cózatl (2000)	Korea	E
<i>L. europaeus 1</i>	González-Cózatl (2000)	Sweden	D
<i>L. europaeus 2</i>	González-Cózatl (2000)	Poland	D
<i>L. flavigularis</i>	González-Cózatl (2000)	Mexico	B
<i>L. granatensis</i>	González-Cózatl (2000)	Spain	D
<i>L. hainanus</i>	AY599077	China	E
<i>L. insularis 1</i>	González-Cózatl (2000)	Mexico	B
<i>L. insularis 2</i>	González-Cózatl (2000)	Mexico	B
<i>L. mandshuricus 1</i>	AJ279422	China	E
<i>L. mandshuricus 2</i>	AJ279423	China	E
<i>L. oiostolus1</i>	AJ279426	China	E
<i>L. oiostolus2</i>	AJ279427	China	E
<i>L. othus</i>	González-Cózatl (2000)	Alaska	E
<i>L. saxatilis 1</i>	AY292730	Africa	C
<i>L. saxatilis 2</i>	González-Cózatl (2000)	Africa	C
<i>L. sinensis 1</i>	González-Cózatl (2000)	China	E
<i>L. sinensis 2</i>	AJ279418	China	E
<i>L. sinensis 3</i>	AJ279419	China	E
<i>L. sinensis 4</i>	AJ279420	China	E
<i>L. sinensis 5</i>	AJ279421	China	E
<i>L. timidus 1</i>	AJ279425	China	E
<i>L. timidus 2</i>	González-Cózatl (2000)	Sweden	E



<i>L. timidus</i> 3	AJ279424	China	E
<i>L. timidus</i> 4	González-Cózatl (2000)	Switzerland	E
<i>L. timidus</i> 5	AB058607	Japan	E
<i>L. timidus</i> 6	González-Cózatl (2000)	Norway	E
<i>L. tolai</i> 1	AY649616	Central Asia	E
<i>L. tolai</i> 2	AY649617	Central Asia	E
<i>L. tolai</i> 3	AY649618	Central Asia	E
<i>L. towsendii</i> 1	González-Cózatl (2000)	Utah, USA	E
<i>L. towsendii</i> 2	González-Cózatl (2000)	USA	E
<i>L. yarkandensis</i>	AY805394	China	E
<i>Oryctolagus</i>	González-Cózatl (2000)	Spain	Outgroup
<i>Pentalagus</i>	AB058606	Japan	Outgroup
<i>Romerolagus</i>	González-Cózatl (2000)	Mexico	Outgroup
<i>Sylvilagus</i>	González-Cózatl (2000)	Mexico	Outgroup

535

540

**Table 2.** Mean genetic distances between the five groups of *Lepus*. Distances are from the complete cytochrome b sequence, estimated with MEGA 2.0, using the Kimura two-parameter method and  $\gamma$  correction ( $\alpha = 0.5$ ) (below diagonal). Standard errors were estimated by the bootstrap method with 10 000 replications (above diagonal).

	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E
Group A		0.009	0.010	0.009	0.009
Group B	0.112		0.008	0.009	0.008
Group C	0.138	0.111		0.009	0.008
Group D	0.127	0.108	0.122		0.008
Group E	0.136	0.122	0.131	0.122	

**Table 3.** Nucleotide divergence ( $D_a$ ) between groups of *Lepus* (DnaSP; Rozas and  
550 Rozas 1999).

	Group A	Group B	Group C	Group D
Group B	0.060			
Group C	0.057	0.060		
Group D	0.056	0.064	0.049	
Group E	0.052	0.049	0.043	0.043

555

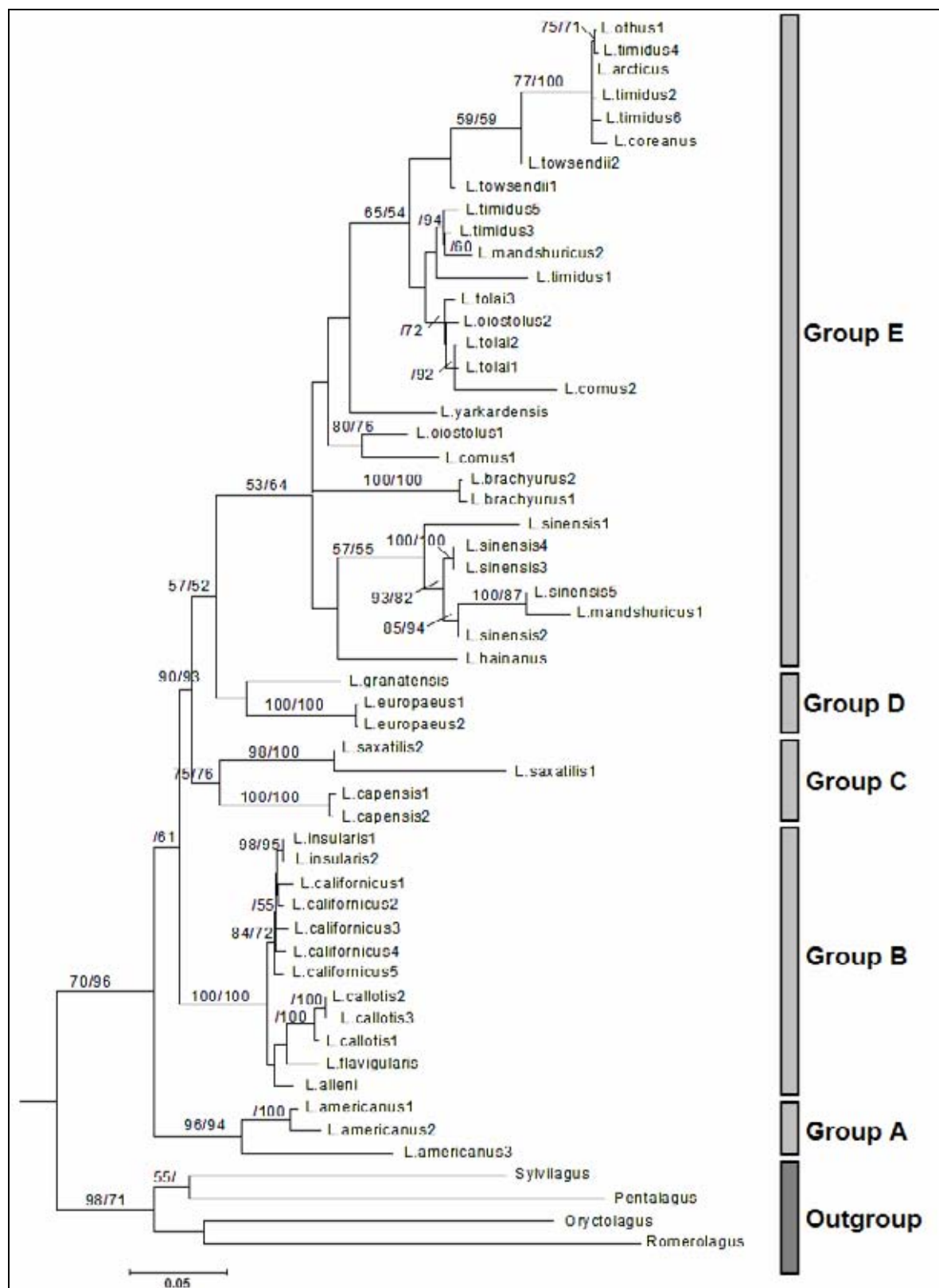
**Figure 1.** Maximum Likelihood tree of the complete cytochrome b sequence, derived based on the General Time Reversible model (GTR; Rodríguez et al., 1990) of DNA substitution (A = 0.2899, C = 0.3309, G = 0.1160, T = 0.2676; I = 0.4978; and  $\alpha =$   
560 1.0920), using the program PHYML and the algorithm of Guindon & Gascuel (2003). Bootstrap values > 50% for maximum likelihood and neighbor-joining analyses (ML/NJ) are given above nodes. Five main groups or clades can be appreciated: Groups A, B, C, D and E.

565 **Figure 2.** Consensus tree of the complete cytochrome b sequence, derived from the parsimony analysis based on heuristic searches with 10 random additions and TBR algorithm. Eighty-eight most parsimonious trees were found, with length (L = 1980), consistency index (CI = 0.354) and retention index (RI = 0.681). Bootstrap values > 50% are given on branches.

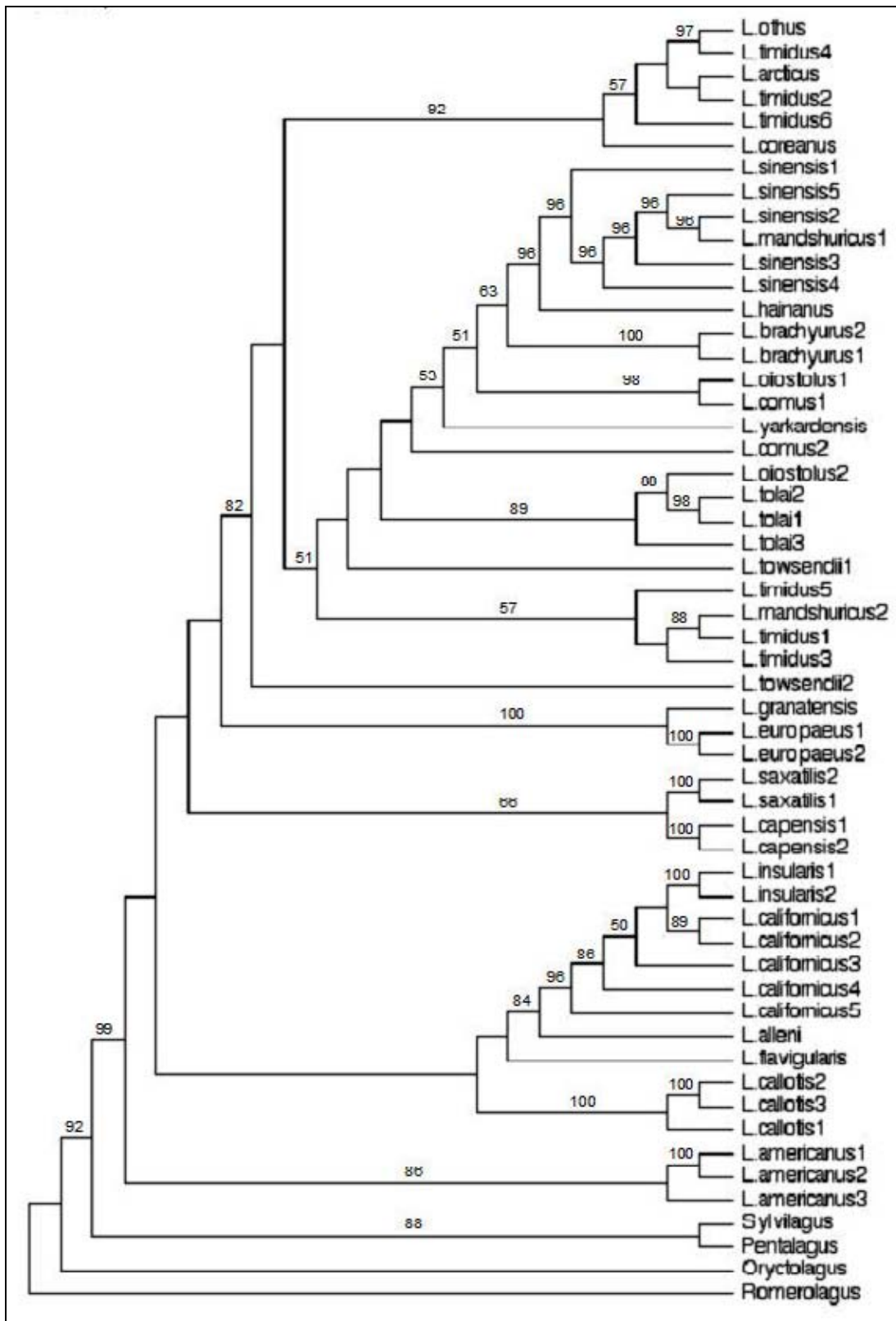
570 **Figure 3.** Minimum spanning network of the five species that are distributed in Mexico. The number along the lines indicates number of mutational steps. Codes are, call: *L. callotis*; ca: *L. californicus*; in: *L. insularis*; fla: *L. flavigularis*; all: *L. alleni*. The location (Mexican state) of each sample is shown on the map.

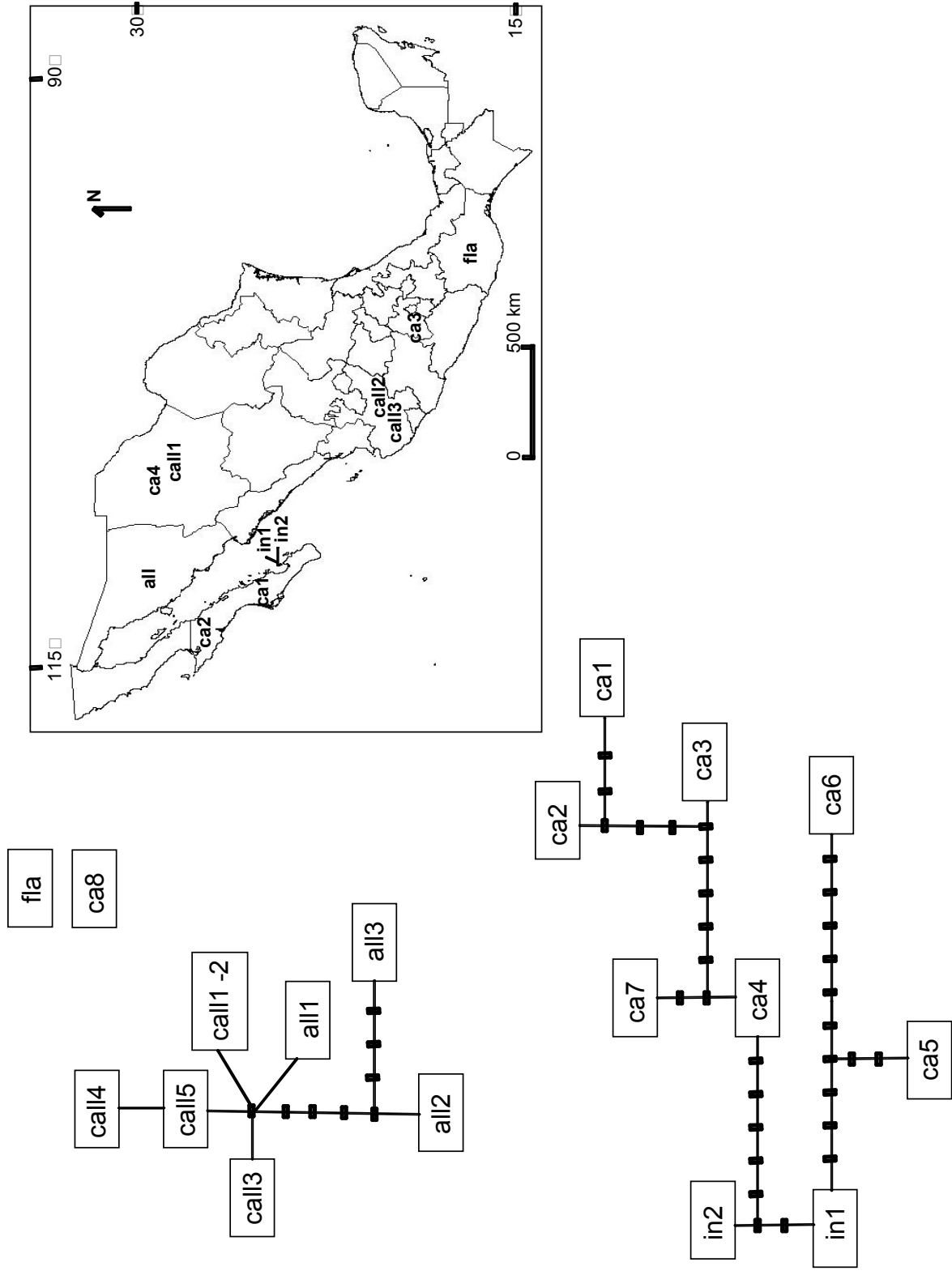
575

Ramírez-Silva *et al.* Fig. 1



Ramírez-Silva *et al.* Fig. 2





## Diversidad Genética entre las poblaciones del Conejo Zacatuche (*Romerolagus diazi*)

Ramírez-Silva<sup>1</sup>, J. P. y F. A. Cervantes<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Biología, Universidad Autónoma de Nayarit, Ciudad de la Cultura “Amado Nervo”. Tepic, Nayarit 63155, México. [pablor@nayar.uan.mx](mailto:pablor@nayar.uan.mx)

<sup>2</sup>Departamento de Zoología, Instituto de Biología, UNAM, Ap. Postal 70-153, México, DF, 04510, México.

### **Resumen**

Se analizaron poblaciones del conejo zacatuche cuya limitada distribución ha sido fragmentada como resultado principalmente de actividades humanas. Se analizaron 27 secuencias de la región control del ADN mitocondrial, de los cuales se observaron 12 haplotipos distintos. La relación que guardan los haplotipos de ejemplares en cautiverio y provenientes de Popocatepetl, permanecen inciertos en relación con el resto del grupo, pero se documentó que existe diferencias genéticas importantes entre las poblaciones de Sierra del Ajusco y Sierra Chichinatzin, ambas poblaciones actualmente separadas por un hábitat fuertemente alterado y la presencia de la autopista México-Cuernavaca. Se propone que una estrategia de conservación para esta especie involucre la preservación de las líneas genéticas observadas, así como el hábitat óptimo favoreciendo el flujo génico dentro de las poblaciones de cada localidad.



## **Abstract**

We analyzed the volcano rabbit populations, this species has limited and fragmented distribution, as results of human activities mainly. 27 sequences of the region control of the mitochondrial DNA was analyzed, of which 12 different haplotipos were observed. The genetic phylogeny among haplotypes from the Zoo and of Popocatepetl remains uncertain in relation with the group, but it has genetic differences between the populations of Sierra del Ajusco and Sierra Chichinatzen, populations that are separated by strongly altered habitat and the Mexico-Cuernavaca freeway. The conservation strategy for volcano rabbit, will need involves the preservation of the genetic lines, as well as the optimal habitat, prompting the genetic flow within the populations of each locality.

Palabras clave: zacatuche, *Romerolagus*, diversidad genética, conservación.

## **Introducción**

El conejo zacatuhe (*Romerolagus diazi*), perteneciente a un género monotípico endémico de México, es una especie que se encuentra en peligro de extinción (Diario Oficial de la Federación, 2001; IUCN, 2008) ya que sus poblaciones se restringen a los alrededores de los volcanes de la región central de la Eje Volcánico Transmexicano, particularmente entre los 3,000 y 4,000 m.s.n.m (Cervantes-Reza, 1980). Esta discontinuidad espacial, ha sido el resultado principalmente de las intensas actividades humanas, tales como la deforestación, la agricultura, la construcción de carreteras y los incendios (Hoth *et al.*, 1987), además del pastoreo de ganado vacuno y ovino y la extracción de gramíneas y suelo (Velázquez *et al.*, 1996), acompañados por el florecimiento y crecimiento de los asentamientos humanos en esta región, potenciado por su cercanía con la ciudad de México.

La fragmentación del hábitat de una especie, limita el flujo génico entre sus poblaciones, situación que con el tiempo podría conducir a la diferenciación genética, mediante la posible fijación de algún alelo (Hedrick, 2000), o bien si las poblaciones son reducidas, éstas serán más propensas a la extinción, al intensificar las consecuencias que pudiera ocasionar una alteración drástica de las condiciones ambientales (Primack *et al.*, 2001), o llevarlas a los llamados vórtices de extinción (Primack *et al.*, 2001; Frankham *et al.*, 2002), los cuales se manifiestan cuando las poblaciones son demográficamente inestables y tienen niveles altos de endogamia, reduciendo la adecuación y produciendo una retroalimentación negativa, aumentando la depresión por endogamia y reduciendo el tamaño poblacional aún más, proceso que se repite hasta llegar a la extinción (Rocha y Gasca, 2007), a menos que los factores demográficos actúen de en sentido opuesto para impedir este proceso. Otros problemas que se han descrito en poblaciones fragmentadas, son el colapso mutacional (*mutational meltdown*), que es la acumulación de mutaciones

deletéreas (Lynch y Gabriel, 1990) y los cuellos de botella, que es la reducción drástica del tamaño efectivo de una población.

Se ha documentado que la fragmentación en poblaciones de mamíferos pequeños generalmente conduce a una diferenciación genética (Galnes *et al.* 1997), incluso especies de mayor tamaño con poblaciones pequeñas contienen nivel pobres de variación genética, como se ha visto en poblaciones de león (*Panthera leo*), Leones marinos (*Mirounga angustirostris*,) y leopardo (*Panthera pardus orientalis*), documentados por Antunes *et al.* (2008); Hoelzel, (1999) y Uphyrkina y O'Brien, (2003), respectivamente. Recientemente se han efectuado muchos estudios enfocados a estudiar la estructura genética de especies amenazadas, para elaborar estrategias de conservación y manejo apropiadas, de lo contrario se incrementaría el riesgo de extinción de las poblaciones aisladas y diferenciadas (Frankham, 2005), ejemplo de ellos son los trabajos de Balakrishan *et al.* (2003) con ciervos (*Cervus eldi*), Eizirik *et al.* (2001) con jaguares (*Panthera onca*), Li *et al.* (2005) con panda rojo (*Ailurus fulgens*) y Márquez *et al.* (2006) con venado de los pantanos (*Blastocerus dichotomus*).

El proceso de fragmentación del hábitat del conejo zacatuche ha sido bien documentado por varios autores. De Poorter y Van Der Loo (1979) y Hall (1981) reportan un área de distribución total de aproximadamente 1,500 km<sup>2</sup>, el cual asumen que esta conformada solamente por una unidad continua que abarcaba las sierra del Ajusco, Chichinautzin y Nevada. Posteriormente Granados (1981) y López-Forment y Cervantes (1981) proponen que la distribución está fragmentada en dos regiones, la Sierra del Ajusco-Chichinautzin y la Sierra Nevada, aunque también reportan la presencia de esta especie en el Nevado de Toluca. Tiempo después Bell *et al.* (1985) y Hoth *et al.* (1985), precisaron que la presencia de esta especie solamente se encuentra en las partes elevadas de los volcanes Iztaccíhuatl y Popocatepetl en Sierra Nevada, y Tláloc y Pelado en el Ajusco-Chichinautzin, constituyendo cuatro unidades aparentemente aisladas. Finalmente,

Velázquez *et al.* (1991), hicieron un análisis detallado de la distribución del conejo zacatuche, indicando que sus poblaciones están fraccionadas en 16 unidades, destacando que existen cuatro fragmentos de mayor tamaño a los que llaman zonas núcleo y que se encuentran exactamente en los volcanes Iztaccíhuatl, Popocatepetl, Tláloc y Pelado y 12 fragmentos de menor tamaño, a los que denomina zonas periféricas, ubicados en los alrededores de los volcanes Tláloc y Pelado.

Desafortunadamente, hasta la fecha no se conoce el efecto de la fragmentación en la diversidad genética de las poblaciones del conejo zacatuche. De hecho, no existen publicaciones previas que nos permitan entender los patrones evolutivos y biogeográficos de las poblaciones fragmentadas de lagomorfos en general, ni de las especies mexicanas en particular. Desde el punto de vista genético, el único antecedente publicado, son los trabajos que diversos autores de manera independiente han realizado, estudiando el cariotipo de esta especie (Uribe *et al.*, 1975; Van der Loo *et al.*, 1979; González-Cózatl, 1992 y Lorenzo, 1996), de los cuales se puede observar que existen diferencias en el número cromosómico ( $2n=48$ ) y en el número fundamental ( $NF=78$ ), en organismos provenientes de dos localidades, lo que indica que es posible que exista divergencia genética en alguna medida.

El objetivo de presente trabajo, es evaluar el impacto que ha tenido la fragmentación, sobre la variación genética de las poblaciones del conejo zacatuche, mediante el análisis de secuencias de ADN mitocondrial, así como comparar la variación genética dentro y entre las poblaciones de conejo zacatuche y compararla con otras especies de lagomorfos, para evaluar las posibles acciones para su conservación.

## **Material y Métodos**

### ***Colecta de Muestras***

Se obtuvieron 25 muestras de ADN de poblaciones silvestres de conejo zacatuche provenientes de nueve localidades distintas, Parres, La Cima, Tres Marías y El Pelado, que se ubican dentro de la Sierra del Ajusco, Tláloc, Chichinautzin, Comalera y Palomo que pertenecen a la Sierra Chichinautzin y Popocatepetl correspondiente a Sierra Nevada (figura 1). Adicionalmente se analizaron dos muestras de individuos de la colonia mantenida en cautiverio en Zoológico de Chapultepec de la Cd. de México. Adicionalmente se utilizaron tres secuencias de liebres (*L. europaeus* (DQ883128 ), *L. timidus* (DQ883205 ) y *L. saxatilis* (AF491450 ), las cuales se eligieron ya que aparentemente el género *Lepus* es el taxón más relacionado con *Romerolagus* (Matthee *et al.* 2004).

Algunas muestras fueron obtenidas a partir de la piel de los ejemplares conservados en la Colección Nacional de Mamíferos del Instituto de Biología, UNAM, para lo cual se tomaron fragmentos de aproximadamente 0.5 cm de diámetro de la base de la oreja; otras muestras fueron obtenidas de tejido congelado, de la colección de tejidos de esta misma institución, tomando alícuotas de aproximadamente un milímetro cúbico, ocasionalmente fue posible obtener muestras de piel y tejido fresco (hígado, riñón y músculo) provenientes de ejemplares que habían sido cazados por los habitantes de las comunidades aledañas a los sitios de estudio. De los organismos en cautiverio, fueron tomadas muestras de pelo. La fecha de colecta, procedencia y en su caso número de catálogo de cada muestra se indican en el cuadro 1.

## ***Extracción, Amplificación y Secuenciación de ADN***

Para la extracción del ADN de las muestras, se empleó el método de lisis celular descrita por Fetzner (1999) y empleando el Kit DNA Blood Cell (Qiagen, 2001), el producto final fue suspendido en 100  $\mu$ L de Buffer 1xTE y almacenado a -20 °C. Se amplificó un fragmento (358 pb) de la región de control (CR-1) por medio de PCR (Elrich, 1989), utilizando los primers Pro1 (CCACCATCAGCACCCAAAGCT), NC4 (AAGAATGGAGTCCCGGTA) y NC5 (CTTTTACTTTAATAAACTCAAGTACTT). La reacción de amplificación se efectuó utilizando aproximadamente 25-40 ng de ADN, bajo las siguientes condiciones de amplificación, un tiempo inicial de desnaturalización de 95 °C por 5 min., 34 ciclos de 60 seg. de desnaturalización a una temperatura de 94 °C, 35 seg. de hibridación a 50 °C y 40 seg. de extensión a 72 °C, finalmente un tiempo de extensión de 4 minutos a 42 °C. El tamaño de los fragmentos fue verificado mediante la visualización de electroforesis en luz ultravioleta. Tanto en la amplificación como en la electroforesis, se aplicaron controles negativos para descartar la posibilidad de contaminación de las muestras. Los productos de PCR fueron purificados empleando dos protocolos distintos, uno de ellos empleando el kit de purificación de PCR QIAquick y el método de purificación Gene-Clean. Finalmente las muestras fueron secuenciadas, empleando un secuenciador automático de DNA, ABI Prism 310. Las secuencias de ADN fueron editadas utilizando el programa Sequencher (Nishimura, 2000).

## ***Análisis filogenético***

Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa Clustal W (Thompson *et al*, 1994), verificando minuciosamente que la alineación se hiciera de manera correcta, para lo cual fue comparada con secuencias de liebre europea (*Lepus europaeus*). Posteriormente

se cuantificaron el número de haplotipos encontrados en las poblaciones, así como la proporción de transiciones y transversiones, el número de sitios variables y los sitios parsimoniosamente informativos.

El análisis filogenético de los haplotipos, se realizó empleando métodos basados en distancia y basados en caracteres, ambos empleando el programa Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP version 4.0 beta; Swofford, 2002). En el método de distancia, se realizó un análisis de Neighbor joining utilizando el criterio de Máxima Verosimilitud empleando un modelo de General Time Reversible (GTR) El nivel de confianza en las topologías obtenidas se realizó efectuando un análisis de bootstrap con 500 réplicas. Se incluyeron las secuencias de tres especies de liebres (*L. europaeus*, *L. timidus* y *L. saxatilis*) en el análisis. Para el método basado en caracteres, se empleó el criterio de Máxima Parsimonia, en el cual cada posición en la secuencia se asume que tiene cuatro estados de carácter (A, C, G, T) y las inserciones y deleciones que forman gaps, fueron considerados como valores perdidos. Se realizó una búsqueda heurística con 1,000 réplicas adicionando taxones al azar y el intercambio de ramas en TBR. A partir de los árboles obtenidos, se produjeron árboles de consenso aplicando el criterio de consenso de mayoría (> 50 %). Finalmente, empleando únicamente las secuencias correspondientes a las localidades de Sierra del Ajusco y Chichinautzin, se generó una red de haplotipos, cuantificando el número de cambios entre cada localidad (Clement *et al.*, 2000).

### ***Diversidad Genética***

Para explorar la diversidad entre las poblaciones del conejo zacatuche, se estimaron algunos parámetros de variación genética tales como la distancia genética entre haplotipos (Kimura-2-parámetros), número de sitios polimórficos (k), número de haplotipos (HT), diversidad haplotípica (Hd) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), para la obtención de estos

parámetros se emplearon los programas DnaSP (Rozas y Rozas, 1999) y MEGA (Kumar *et al.* 1993).

Se evaluó el grado de significancia de la variación entre las poblaciones mediante un análisis de variación molecular (AMOVA; Excoffier *et al.* 1992) implementado en ARLEQUIN ver. 3.1 (Excoffier *et al.* 2005). Así mismo, se obtuvieron estimaciones del flujo génico mediante los parámetros de índice de diferenciación genética ( $F_{ST}$  y  $K_{ST}$ ) y tasa de migración (Nm), los cuales fueron estimados entre cada par de poblaciones empleando el programa DnaSP (Rozas y Rozas, 1999).

## **Resultados**

### ***Análisis Filogenético***

Se analizaron 27 secuencias de la región control en las poblaciones de conejo zacatuche con una longitud de 358 pb, encontrando 29 (8.10%) sitios variables y 26 (7.26%) sitios parsimoniosamente informativos, con una proporción de transiciones / transversiones igual a 4.6 (Ti/Tv). Utilizando el programa Arlequín (Excoffier *et al.* 2005), se determinaron 12 haplotipos distintos, los cuales fueron nombrados RLG y numerados del 01 al 12 sucesivamente, el cuadro 1 muestra la localidad a la que corresponden los haplotipos, así como el número de secuencias que lo constituyen.

En el análisis filogenético empleando Neighbor Joining (Fig. 3), se observan dos filogrupos, el primero de ellos contiene los haplotipos RGL01 al RLG07 con un valor de Bootstrap de 48, y otro conformado por los haplotipos RGL08 al RLG11 con un valor de Bootstrap de 66; Es decir, que el primer grupo contiene las localidades correspondientes a la Sierra del Ajusco y del Popocatepetl y el segundo grupo corresponde con las localidades de Chapultepec y Sierra Chichinautzin, distinguiéndose en este último dos subgrupos, correspondientes a las localidades Tláloc-Chichinautzin y Comalera-Palomo (Figura 3).



Por otro lado, el análisis de Máxima Parsimonia generó tres árboles igualmente parsimoniosos con una longitud de 136, un índice de consistencia (CI) de 0.721 y un índice de retención (RI) de 0.969, cuya topología muestra en la parte basal al haplotipo que corresponde al Popocatepetl, seguido por dos clados constituidos por haplotipos correspondientes a las localidades de Tláloc-Chichinautzin y Comalera-Palomo respectivamente, posteriormente una rama con el haplotipo de Chapultepec y en la parte apical los haplotipos correspondientes a la Sierra del Ajusco. (Figura 4).

De igual modo, la red de haplotipos muestra que las localidades correspondientes a la zona de Sierra del Ajusco se separan evidentemente (nueve diferencias) de las correspondientes a la Sierra Chichinautzin, distinguiéndose en ésta última dos sub grupos que corresponden a las localidades Tláloc-Chichinautzi y Comalera-Palomo respectivamente. (Figura 5).

### ***Diversidad Genética***

Todas las localidades presentaron un haplotipo exclusivo, excepto las localidades Parres y Tres Marías, las cuales presentaron dos haplotipos. Se encontraron en promedio 1.2 haplotipos por localidad, sin que ninguno de ellos esté compartido. Se puede observar, que las secuencias de los haplotipos RLG07 y RLG08 (Popocatepetl y Chapultepec respectivamente), presentan entre ambos cinco sitios que son exclusivos (*singleton*) y que los diferencia del resto de las localidades.

En cuanto a la composición nucleotídica, se observa que las frecuencias observadas en las secuencias del conejo zacatuche son muy similares a las observadas en el grupo externo, *L. europaeus*, *L. timidus* y *L. saxatilis*, (A=32.2%), T= 31.6%, C= 26.7% y G= 9.4%) en donde se presenta una mayor proporción de Adenina, seguida por Citosina, Timina y finalmente Guanina, es evidente que no existe una saturación de Guanina, lo que podría provocar una falla en detectar un la señal filogenética (González, 1992).

El valor de distancia genética promedio (Tamura-Nei) de los haplotipos es de 0.036, con un error estándar de 0.007. Las distancias observadas entre los haplotipos que corresponden a cada una de las localidades tanto de Sierra del Ajusco y Sierra Chichinautzin son un orden de magnitud menores a las que se presentan en relación a las otras localidades, excepto en el caso del haplotipo RLG08 que corresponde a los ejemplares de Chapultepec y que presenta una distancia muy baja con respecto a los haplotipos de la Sierra Chichinautzin. (Cuadro 2). De acuerdo con estos resultados de distancia genética y los observados en el análisis filogenético, se tomó la decisión de conformar tres grupos para el análisis poblacional, uno correspondiente a las localidades de Sierra del Ajusco, otro a las localidades de Comalera-Palomo y uno más de Tláloc-Chichinautzin. Los haplotipos RGL07 y RGL08 (Popocatepetl y Chapultepec), no fueron agrupadas, debido a que el análisis solo se efectuó con poblaciones silvestres de la región Ajusco-Chichinautzin, zona que presenta los fenómenos de fragmentación inducida más severos (Cuadro 1).

La población de Sierra del Ajusco ( $n=17$ ) presenta un valor de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) de 0.01099 (0.00221), similar a la observada en la población de Chichinautzin ( $n=7$ ) con un valor de 0.01224 (0.00169). Presentando la primera un mayor número de haplotipos ( $HT=6$ ) y un menor número de sitios polimórficos ( $k=3.933$ ) que Chichinautzin ( $HT=4$  y  $k=5.000$ ). Los valores obtenidos de en la prueba D Tajima fueron de 0.97515 y 1.79485 respectivamente. El índice de fijación resultó relativamente elevado ( $F_{st}=0.74$ ), entre las poblaciones de Sierra del Ajusco y Chichinautzin, así mismo la tasa de migración fue muy baja ( $Nm=0.18$ ), presentando diferencias altamente significativas entre ambas poblaciones (Nei, 1973), en comparación, la tasa de migración obtenida entre los subgrupos Tláloc-Chichinautzin y Comalera-Palomo, que conforman la localidad de Sierra Chichinautzin es más elevada ( $Nm=0.48$ ), sin presentar diferencias significativas. El análisis de AMOVA indica que la mayor parte de la variación ocurre entre los grupos (71.96 %) y en

menor grado dentro de estos grupos (36.46 %), solamente el 3.73 % de la variación se presenta dentro de las localidades analizadas.

## **Discusión**

### ***Análisis Filogenético***

El árbol de distancia muestra que existen por lo menos dos grupos filogenéticos, ya que aunque los valores de Bootstrap del grupo Ajusco son bajos (48), excluyendo el haplotipo del Popocatepetl el valor de soporte es muy elevado (99); Por el contrario, situación contraria a lo que ocurre con los valores presentados en el grupo Chichinautzin, los cuales son **aceptables** (66) incluyendo el haplotipo de Chapultepec. No obstante, el árbol de parsimonia aunque muestra una topología distinta, permite ver que la agrupación de los subclados Tláloc-Chichinautzin y Comalera-Palomo se mantiene, aunque no forman un grupo monofilético, del mismo modo el clado del Ajusco se mantiene, pero se muestra aparentemente más relacionado con Chapultepec.

Existe poca información referente al origen de los organismos que se mantiene en cautiverio en Chapultepec, aunque está documentada la captura de los ejemplares para el establecimiento de dicha colonia, no queda claro las localidades exactas de su captura (Velázquez *et al.*, 19991). En el presente análisis, aun no queda claro su origen, siendo necesario un análisis más exhaustivo para tales fines (**NO se han mezclado???**). De igual modo, la relación de la población de Popocatepetl permanece incierta, pues aunque el análisis de parsimonia lo sitúa en la base del árbol, es posible que dicho análisis sea más sensible a los cambios puntuales en la secuencia.

o obstante, es claro que los haplotipos se agrupan de acuerdo a su localidad de procedencia, generando cinco clados: Popocatepetl, Chapultepec, Ajusco, Tláloc-Chichinautzin, y Comalera-Palomo, sin que el análisis haya podido ser concluyente en referencia a las relaciones que guardan estos grupos entre sí. Posiblemente un mejor tamaño de muestra pueda esclarecer la situación. Debe considerarse además, un muestreo más extensivo de la Sierra Nevada, permitiendo incluir en el análisis organismos de

distintos puntos de los Volcanes Iztacchíhuatl y Popocatepetl, los cuales abarcan una gran extensión geográfica.

Por otro lado, la red de haplotipos permite ver con mayor detalle la diferenciación genética que existe en la zona de la Sierra del Ajusco y Chichinautzin, mostrando una evidente distinción entre los haplotipos de ambas localidades. Particularmente, esta región ha sufrido un enorme deterioro del hábitat especialmente en los alrededores de los volcanes Pelado y Tláloc en donde existen comunidades humanas en expansión como Parres y Tres Marías, además de estar separados desde 1952 por la autopista México-Cuernavaca, la cual presumiblemente representa una importante barrera geográfica, la cual pasa justo por en medio de ambos volcanes (Figura 2 y 5). Es importante destacar como nuevamente se subdividen los haplotipos de Chichinautzin en dos grupos; esto podría ser el resultado de una fragmentación ecológica, como lo destacan Velázquez *et al.*, (1991), al documentar que el conejo zacatucho prefiere ampliamente, el hábitat de Pinar abierto con un estrato herbáceo denso y homogéneo de *Pinus* spp. y *Festuca toluensis*, que cualquiera de las otras nueve unidades de vegetación presentes en la zona.

### ***Diversidad Genética***

La proporción de número de haplotipos encontrados en el presente trabajo es similar al reportado en otras especies de mamíferos, empleando el mismo marcador molecular. Arctander *et al.* (1996) reportan la presencia de 40 haplotipos para un tamaño de muestra de 44 gacelas, y Prager *et al.* (1998) documentan la presencia de 54 haplotipos en un estudio con un tamaño poblacional de 76 ratones domésticos. Con relación al número de sitios variables (29 sitios variables = 8.10 %) este valor resulta ser conservador comparado con otros lagomorfos como *Lepus saxatilis* que presenta una variación de 19.76% de sitios variables empleando un fragmento de 420 pb (Kryger *et al.*, 2004), es posible que el tamaño de muestra analizado subestime la variación genética que presenta el conejo zacatucho.

A nivel poblacional, las localidades de Sierra del Ajusco y Sierra Chichinautzin, presentan valores de diversidad genética (sitios polimórficos y diversidad nucleotídica) similares a los reportados para otras poblaciones mexicanas de lagomorfos, como la liebre torda (*Lepus callotis*) y la liebre de cola negra (*L. californicus*; Mancebo, 2007) y a otras especies europeas como *L. corsicanus* y *L. europaeus* (Pierpaoli *et al.*, 1999 y Thulin *et al.*, 2003), estos valores son comparables también a los valores observados en poblaciones de otras especies de mamíferos como los lemmings (*Dicrostonyx groenlandicus*) reportados por Ehrich *et al.* (2000) y lobos europeos (Vilà *et al.*, 1999). Esto indica que la diversidad genética del conejo zacatuche, se encuentra dentro de los rangos esperados para el taxón y el posible aislamiento de las poblaciones, no ha repercutido en la pérdida de variabilidad, como es el caso de las poblaciones fragmentadas de la especie endémica del Istmo de Tehuantepec *L. flavigularis*, reportada por Mancebo (2007). Otras especies con rangos de distribución mayor, como el jaguar (*Panthera onca*), Brunhoff *et al.* (2003) y poblaciones de roedores (*Microtus oeconomus*), presentan valores de variabilidad un orden de magnitud más elevados.

Si bien el nivel de diversidad genética es equiparable al de otros taxones, los valores del índice D de Tajima, que muestran diferencias significativas, el valor de diferenciación genética relativamente elevado y la estimación de un bajo flujo génico, indican que las poblaciones del conejo zacatuche que habitan en Sierra del Ajusco y Sierra Chichinautzin podrían ser poblaciones cerradas, similar a otras poblaciones de lagomorfos (Kryger, 2004 y Slimen *et al.* 2006). Esto tiene repercusiones importantes en la conservación, pues en poblaciones totalmente cerradas, como es el caso de la colonia de zacatuche que se mantiene en el zoológico de Chapultepec, se ha documentado la pérdida de seis loci, de un total de 31 loci analizados por medio de RAPDS, además de la pérdida del 88% de su variabilidad en otros dos loci (Solomon, *et al.*, 2005). Ciertamente el grado de endogamia que podría presentar una colonia en cautiverio es potencialmente mayor al de las poblaciones silvestres, sin embargo, es un claro reflejo de lo que podía ocurrir si el flujo

génico entre ambas poblaciones silvestres se interrumpe por completo. Por ello el riesgo de perder variabilidad genética es latente.

La mayor parte de la variación ocurre entre Sierra del Ajusco y Sierra Chichinautzin, existiendo líneas genéticas diferenciadas en ambas localidades; Dadas las condiciones actuales de la alteración del hábitat y la presencia de una autopista y carretera entre ambas localidades, parece imposible que ambas poblaciones puedan intercambiar información genética. Por otra parte, las localidades de la Sierra Chichinautzin, existe ligero grado de variación, sin llegar a ser significativo, aunque posiblemente sea un indicio de fragmentación, al no compartir haplotipos. En poblaciones fragmentadas, es importante conservar las líneas genéticas existentes, las cuales, comúnmente se pierden gracias al efecto fundador; A este respecto, Gompper *et al.* (1997) documentaron que los linajes pueden desaparecer a ritmos acelerados, encontrando pérdidas entre 3 y 87% de las líneas maternas de mamíferos en períodos muy cortos.

Es imperante, para la conservación de las poblaciones del conejo zacatuche, tratar de preservar, tanto las líneas genéticas que han sido documentadas en este estudio, como el hábitat que se ha registrado como el de mayor preferencia por esta especie (Velazquez *et al.*, 1991), conservando las condiciones del hábitat presentes en la sierra del Ajusco, las cuales permiten un mayor flujo génico y tratando de detectar corredores que permitan un mayor movimiento de organismos entre las localidades de la Sierra Chichinautzin, impidiendo que ambas poblaciones pierdan contacto.

## **Referencias**

Antunes, A. J., Troyer, M. Roelke, J. Pecon-Slattey, C. Packer, Ch. Winterbach, H. Winterbach, G. Hemson, L. Frank, P. Stander, L. Siefert, M. Driciru, P. Funston, K. Alexander, K. Prage, G. Mills, D. Wild, M. Bush y S. O'Brien y W. Johnson. 2008. The Evolutionary Dynamics of the Lion *Panthera leo* Revealed by Host and Viral Population Genomics 4(11):1-11.

Arctander, P., P. W. Kat, R. A. Aman y H. R. Siegmund. 1996. Extreme genetic differences among populations of *gazelle granti*, Grant's gazelle, in Kenya. Heredity 76:465-475.

Balakrishan, C. N. S. L. Monfort, A. Gaur, L. Singh y M. D. Sorenson. 2003. Phylogeography and conservation of Eld's deer (*Cervus eldi*). Molecular Ecology 12:1-10.

Bell, D., J. Hoth. A. Velázquez, F. J. Romero, L. León, y M. Aranda. 1985. A survey of the distribution of the volcano Rabbit *Romerolagus diazi*, an endangered mexican endemic. Dodo, J. Jersey Wildlife Preserv. Trust International 22, 12-18.

Brunhoff, C., K. E. Galbreath, V. B. Fedorv, J. A. Cook, y M. Jaarola (2003).

Holarctic phylogeography of the root mole microtus oeconomicus); implications for late Quaternary biogeography of high latitudes. Molecular Ecology 12:957-968.

Cervantes, F., C. Lorenzo, y R. S. Hoffman. 1990. *Romerolagus diazi*, Mammalian Species 360:1-7.

Clement, M., D. Posada, K. A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular Ecology 9:1657-1660.



De Poorter, M y W. Van Der Loo. 1979. Le lapin de Diaz ou teporingo. ZooAnvers Societé Royale de Zologic de Anvers 45:15-19.

Diario Oficial de la Federación. 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección Ambiental -Especies de flora y fauna silvestres en México- Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio -Lista de especies en riesgo. Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México.

Eizirik E., J.H. Kim, M. Menotti-Raymond, P.G. Crawshaw, S.J. O'Brien y W.E. Johnson (2001). Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology* 10:65-79.

Frankham R., J.D. Ballou, y D.A. Briscoe. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge, Reino Unido.

Gaines, M. S., J. E. Diffendorfer, R. H. Tamarin, y T. S. Whittam. 1997. The Effects of Habitat Fragmentation on the Genetic Structure of Small Mammal Populations. *Journal of Heredity* 88:294-304.

González-Cózatl (1992). Comparación cromosómica entre el conejo zacatuche, (*Romerolagus diazi*) y la liebre torda (*Lepus callotis*), Mammalia: Lagomorpha. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México. 52 pp.

González-Cózatl, F. 2000. Molecular Systematics of the Genus *Lepus* in North America (Mammalia: Lagomorpha). Ph. D. Thesis. Brigham Young University, USA. 69 p.

Granados, H. 1981. Some basic information on the volcano rabbit. In: World Lagomorph Conference. Ed. By K. Myers and C. D. MacInnes, Guelph, Ontario: University of Guelph.

Hall, E. R. 1981. *The Mammals of North America*. Vol 1. 2<sup>nd</sup>.ed. New York. John Willey.

Hedrick, P. W. 2000 *Genetics of Populations* (Second Edition). Jones and Bartlett, Boston, Massachusetts, 553p.

Hoelzel, R. 1999. Impact of population bottlenecks on genetic variation and the importance of life-history; a case study of the northern elephant seal. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 23–39 .

Hoth, J. A. Velazquez, F. J. Romero, L. León, M. Aranda y D. J. Bell. (1987). The volcano rabbit: a striking distribution and a threatened habitat. *Oryx* 21:85-91.

Hoth, J., A. Velazquez, F. J. Romero, L. León, M. Aranda y D. J. Bell (1985). *The volcano Rabbit: a shrinkin* Kryger, U. T. J. Robinson y P. Bloomer (2004).

IUCN, Conservation International, Arizona State University, Texas A&M University, University of Rome, University of Virginia, Zoological Society London. 2008. *An Analysis of Mammals on the 2008 IUCN Red List* <[www.iucnredlist.org/mammals](http://www.iucnredlist.org/mammals)>. 09 diciembre 2008.

Population structure and history of southern African scrub hares, *Lepus saxatilis*. *J. Zool., Lond.* 263:121–133.

Kryger, U., T. J. Robinson y P. Bloomer. 2004. Population structure and history of southern African scrub hares, *Lepus saxatilis* *Journal Zoology of London* 263:121–133.

Li, M., F. Wei, B. Goosens, Z. Feng, H. B. Tamate, M. W. Bruford y S. M. Funk. 2005. Mitochondrial phylogeography and subspecific variation in the red panda (*Ailurus fulgens*): implications for conservation. *Molecular Phulogenetics and Evolution* 36:78-89.

López-Forment, W. y F. Cervantes. 1981. Preliminary observations on the ecology of *Romerolagus diazi* in Mexico. In K. Myers y C. D. MacInne (Eds.). *World Lagomorph Conference*. Guelph, Ontario: University of Guelph.

Lorenzo, C., F. A. Cervantes, y J. Vargas. 2003. Chromosomal relationships among three species of Jackrabbits *Lepus* (Leporidae) from México. *Western North American Naturalists* 63:11-20.

Mancebo, Y. 2007. Filogeografía e historia demográfica poblacional de *Lepus flavigularis* (Mammalia: Lagomorpha) basada en ADN mitocondrial. Tesis de maestría. Colegio de la frontera sur, 93 pp.

Márquez, A. J. E. Maldonado, S. González, M. D. Beccacesi, J. E. Garcia y J. M. B. Duarte. 2006. Phylogeography and Pleistocene demographic history of the endangered marsh deer (*Blastocerus dicotomus*) from the Río de la Plata Basin. *Conservation Genetics* 7:563-575.

Matthee, C. A., B. J. Van Vuren, D. Bell y T. J. Robinson. 2004. A molecular supermatrix of the rabbits and hares (Leporidae) allows for the identification of five intercontinental exchanges during the Miocene. *Systematic Biology* 53:433-447

Matthew, E. P. Gompper, B. Stacey y J. Berger. 1997. Conservation implications of the natural losslineages in wild mammals and birds. *Conservation Biology* 11(4):857-867.

Nishimura D. Biotech Software & Internet Report. April 1, 2000, 1(1-2):24-30.

Pierpaoli, M., F. Riga, V. Trocchi y E. Randi. 1999. Species distinction and evolutionary relationships of the italian hare (*Lepus corsicanus*) as described by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular Ecology* 8:1805-1817.

Prager, E. M; C Orrego y R. D. Sage. 1998. Genetic variation and phylogeography of central Asian and other house mice, including a major new mitochondrial lineage in Yemen. *Genetics* 150:835-861.

Primack R., R. Rozzi, P. Feisinger, R. Dirzo y F. Masardo. 2001. *Fundamentos de conservación biológica. Fondo de cultura económica, México.*

QUIAGEN, Genomic DNA Handbook, August 2001 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Rocha, M y J. Gasca. 2007. Ecología molecular de la conservación *In* Eguiarte, L. E., V. Souza y X. Aguirre (comps.). *Ecología molecular*. 1a. ed. Instituto Nacional de Ecología, Semarnat y Comisión Nacional para el Conocimiento. Ciudad de México. pags. 251-278.

Rozas, J. and R. Rozas. 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetic and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15:174-175.

Solomon, V. M., J. L., Contreras, P. D. Matzumura y Vásquez, C. G. 2005 Estimación de la variabilidad genética en el teporingo (*Romerolagus diazi*) en cautiverio. *Veterinaria México* 36(2):119-126.

Swofford, D. L. 2002. PAUP Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other methods. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Thompson, J. D., D.G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

Uphyrkina O. y S. O'Brien (2003). Applying molecular genetic tools to the conservation and action plan for the critically endangered Far Eastern leopard (*Panthera pardus orientalis*). *C. R. Biologies* 326: S93–S97.

Uribe, A., M., S. García-Rey y A. Laguardia-Figueras. 1975. Chromosome analysis of *Romerolagus diazi* (Diaz). *Mammalian Chromosomes Newsletter*, 16(3):116-117.

Van der Loo, W., M. Uribe-Alcocer y J. Schroder. 1979. The giemsa banded karyotype of *Romerolagus diazi*. *Hereditas*, 91:215-218.

Velázquez, A. (1993). Man-maded and ecological habitat fragmentation: study case of the Volcano Rabbit (*Romerolagus diazi*). *Z.Säugetierkund*, 58:54-61.

Velázquez, A., F. J. Romero y J. López-Paniagua. 1996. Ecología y conservación del conejo zacatuche *Romerolagus diazi* y su hábitat. Fondo de Cultura Económica y Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 204 p.

**Cuadro 1.** Procedencia de las muestras analizadas en el estudio, indicando el haplotipo que presentan y el grupo al que pertenecen.

Grupo	Haplotipo	Clave	Localidad	Coordenadas	Fecha de colecta	No. De catálogo	Tipo de muestra
AJUSCO	RLG01	PAR_B	PARRES	19° 08' 12.75" N - 99° 10' 58.64" W	22/09/1992	34336	Músculo
		PAR_D	PARRES	19° 08' 12.75" N - 99° 10' 58.64" W	22/09/1992	34335	Músculo
		PAR_E	PARRES	19° 08' 12.75" N - 99° 10' 58.64" W	09/10/1979	16949	Piel
		PAR_F	PARRES	19° 08' 12.75" N - 99° 10' 58.64" W	05/08/1979	16934	Piel
	RLG02	PAR_A	PARRES	19° 08' 12.75" N - 99° 10' 58.64" W	06/06/1992	34840	Músculo
		PAR_C	PARRES	19° 08' 12.75" N - 99° 10' 58.64" W	22/09/1992	34824	Músculo
	RLG03	CIM_A	CIMA	19° 06' 18.27" N - 99° 14' 48.02" W	10/11/2002	16898	Piel
		CIM_B	CIMA	19° 06' 18.27" N - 99° 14' 48.02" W	03/12/1978	16888	Piel
		CIM_C	CIMA	19° 06' 18.27" N - 99° 14' 48.02" W	10/11/2002	16933	Músculo
		CIM_D	CIMA	19° 06' 18.27" N - 99° 14' 48.02" W	10/11/2002	16899	Músculo
	RLG04	PEL_A	PELADO	19° 08' 46.33" N - 99° 12' 56.24" W	26/06/1949	356	Piel
		PEL_B	PELADO	19° 08' 46.33" N - 99° 12' 56.24" W	26/06/1949	357	Piel
	RLG05	TMA_A	TRES MARÍAS	19° 04' 46.99" N - 99° 14' 53.04" W	20/01/1995	37823	Piel
		TMA_D	TRES MARÍAS	19° 04' 46.99" N - 99° 14' 53.04" W	12/07/1954	13671	Piel
TMA_C		TRES MARÍAS	19° 04' 46.99" N - 99° 14' 53.04" W	13/01/1995	37822	Piel	
TMA_E		TRES MARÍAS	19° 04' 46.99" N - 99° 14' 53.04" W	01/06/2002	nd	Músculo	
RLG06	TMA_B	TRES MARÍAS	19° 04' 46.99" N - 99° 14' 53.04" W	01/06/2002	nd	Músculo	
CHICHINAUTZIN	RLG09	TLA_A	TLÁLOC	19° 05' 19.69" N - 99° 08' 02.87" W	19/06/2004	nd	Piel
		TLA_B	TLÁLOC	19° 05' 19.69" N - 99° 08' 02.87" W	19/06/2004	nd	Piel
	RLG10	CHI_A	CHICHINAUTZIN	19° 05' 16.01" N - 99° 10' 54.44" W	23/06/1979	16929	Piel
		CHI_B	CHICHINAUTZIN	19° 05' 16.01" N - 99° 10' 54.44" W	23/06/1979	16928	Piel
	RLG11	COM_A	COMALERA	19° 03' 59.77" N - 99° 12' 55.03" W	01/09/1979	16956	Piel
		COM_B	COMALERA	19° 03' 59.77" N - 99° 12' 55.03" W	01/09/1979	16955	Piel
RLG12	PAL	PALOMO	19° 03' 38.99" N - 99° 12' 42.21" W	17/08/1980	13800	Piel	
	RLG07	POP	POPOCATEPETL	19° 01' 08.97" N - 98° 37' 39.26" W	15/12/2003	nd	Músculo
	RLG08	CHA_A	CHAPULTEPEC		01/12/2001	nd	Pelo
		CHA_B	CHAPULTEPEC		01/12/2001	nd	Pelo

**Cuadro 2.** Distancias genéticas entre las poblaciones del conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*) empleando el método de Tamura-Nei. Sobre la diagonal se muestra los valores de error estándar, estimados a partir de una prueba de bootstrap con 1,000 replicas. Los valores en negritas indican los mas bajos encontrados y que determinaron la conformación de grupos.

	TIMIDUS	EUROPAEUS	SAXATILIS	RLG01	RLG02	RLG03	RLG04	RLG05	RLG06	RLG07	RLG08	RLG09	RLG10	RLG11	RLG12
TIMIDUS		0.023	0.023	0.026	0.026	0.025	0.026	0.026	0.026	0.022	0.021	0.022	0.021	0.024	0.023
EUROPAEUS	0.145		0.022	0.019	0.019	0.020	0.019	0.018	0.019	0.024	0.024	0.025	0.025	0.025	0.024
SAXATILIS	0.154	0.143		0.023	0.023	0.023	0.023	0.024	0.024	0.024	0.023	0.023	0.023	0.024	0.025
RLG01	0.180	0.122	0.169		0.003	0.004	0.006	0.006	0.005	0.012	0.012	0.011	0.012	0.013	0.012
RLG02	0.183	0.122	0.172	<b>0.003</b>		0.005	0.006	0.006	0.004	0.012	0.012	0.011	0.012	0.012	0.013
RLG03	0.172	0.129	0.168	<b>0.006</b>	<b>0.009</b>		0.007	0.007	0.006	0.011	0.012	0.011	0.012	0.012	0.012
RLG04	0.180	0.115	0.172	0.014	0.012	0.020		0.004	0.004	0.013	0.013	0.012	0.012	0.013	0.013
RLG05	0.188	0.108	0.180	0.014	0.012	0.020	<b>0.006</b>		0.004	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013
RLG06	0.180	0.115	0.180	0.009	0.006	0.014	<b>0.006</b>	<b>0.006</b>		0.013	0.013	0.012	0.012	0.013	0.013
RLG07	0.148	0.162	0.176	0.045	0.048	0.039	0.054	0.054	0.054		0.010	0.010	0.010	0.009	0.010
RLG08	0.139	0.162	0.169	0.045	0.048	0.045	0.054	0.054	0.054	0.035		0.007	0.008	0.008	0.008
RLG09	0.143	0.169	0.164	0.042	0.039	0.042	0.045	0.051	0.045	0.032	0.014		0.004	0.006	0.008
RLG10	0.139	0.169	0.172	0.048	0.045	0.048	0.045	0.051	0.045	0.038	0.020	<b>0.006</b>		0.007	0.007
RLG11	0.158	0.169	0.172	0.048	0.045	0.048	0.051	0.051	0.051	0.026	0.020	0.012	0.017		0.005
RLG12	0.155	0.166	0.180	0.048	0.051	0.048	0.051	0.051	0.051	0.032	0.026	0.023	0.017	<b>0.012</b>	

**Cuadro 3.** Análisis de varianza entre las localidades Ajusco y Chichinautzin. \* indica que contribuye significativamente a la varianza total (0.5).

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	Porcentaje de variación
Entre regiones	1	71.965	6.68296 *	74.80
Entre poblaciones dentro de la región	6	36.468	2.01796	22.59
Dentro de las poblaciones	16	3.733	0.23333	2.61
Total	23	112.167	8.93425	





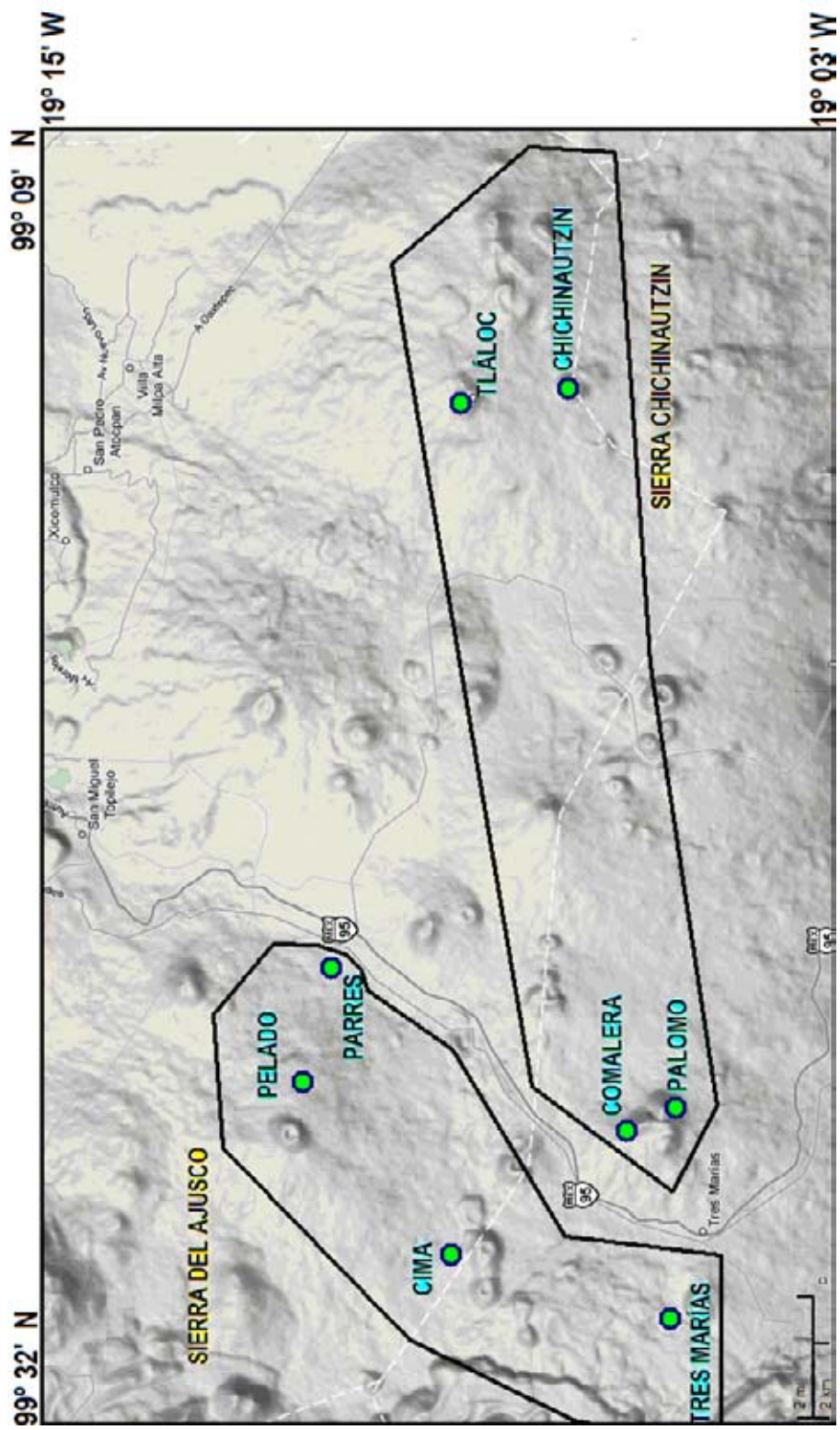


Figura 2.

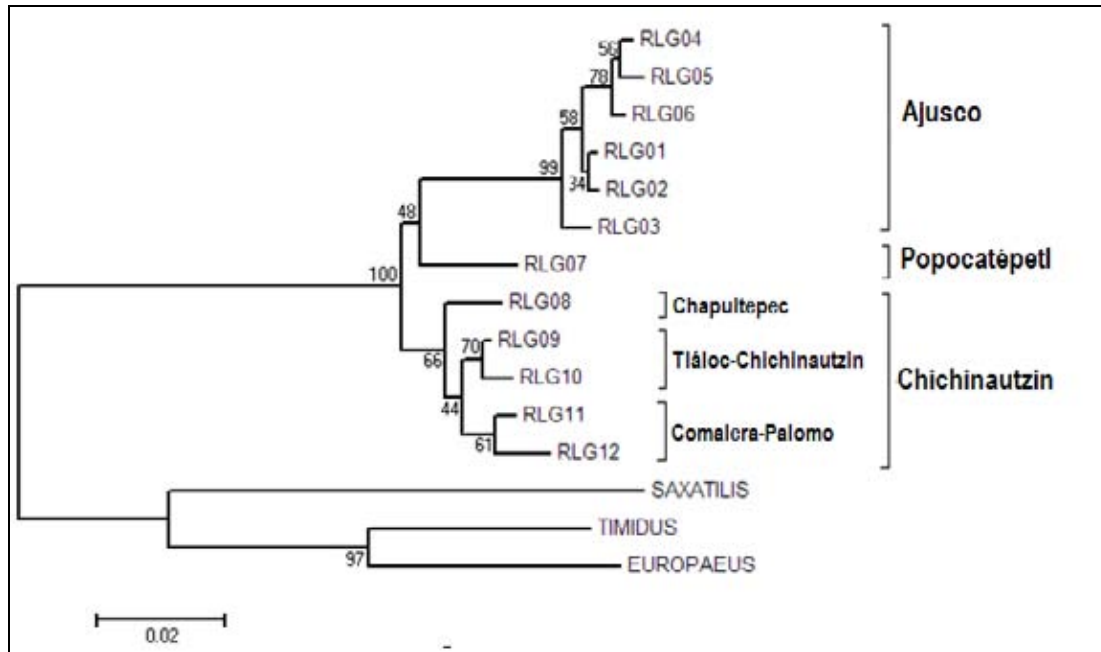


Figura 3.

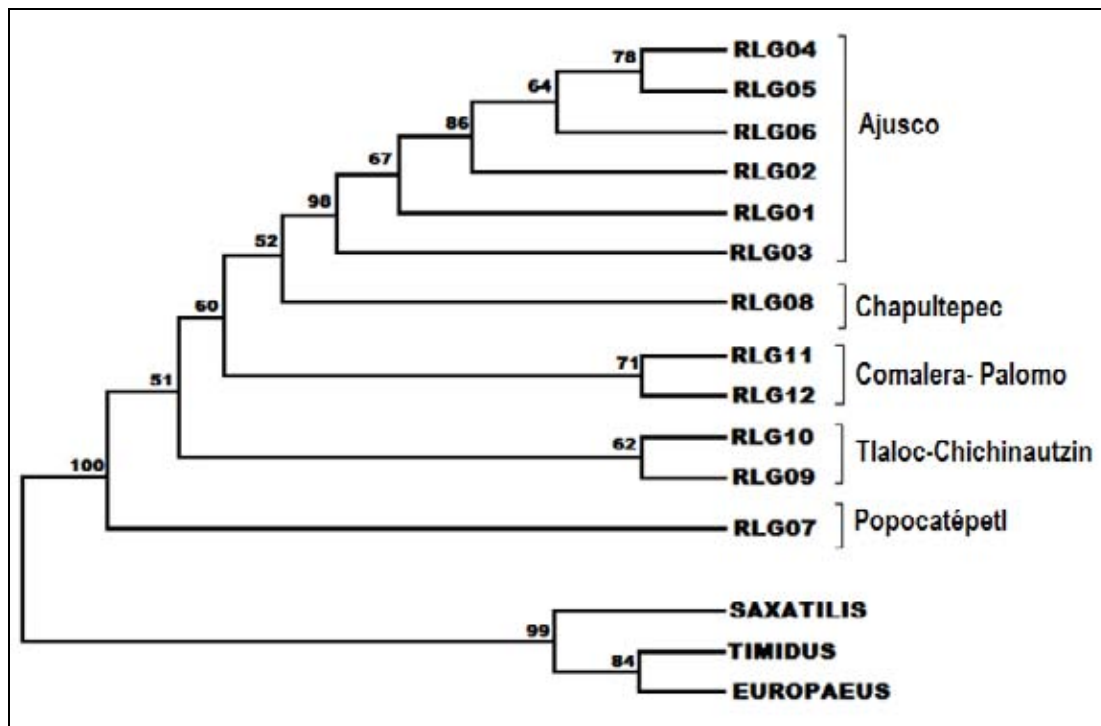


Figura 4.

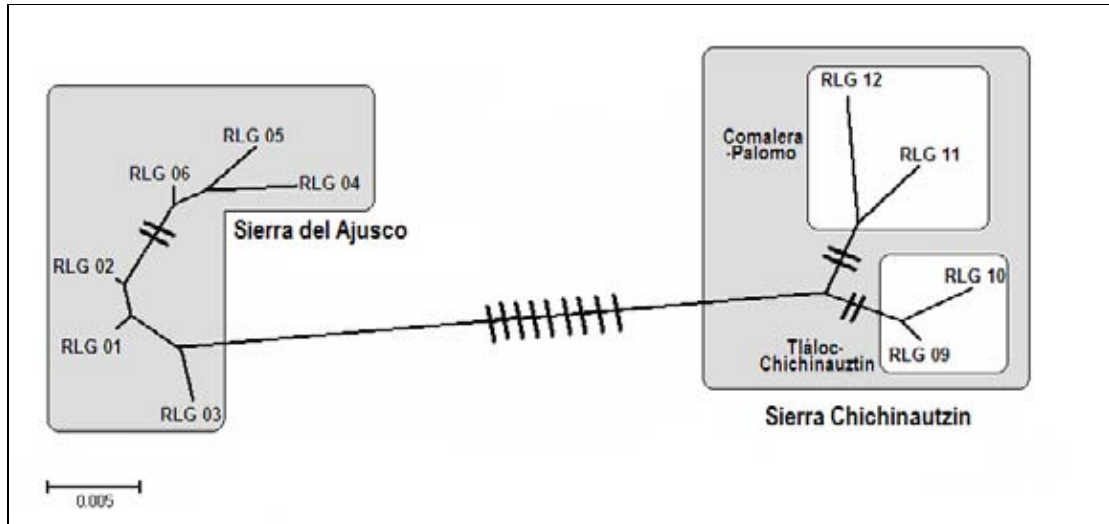


Figura 5.

**Figura 1.** Localidades de distribución de las poblaciones del conejo zacatucho. Mostrando los cuatro volcanes (Pelado, Tláloc, Iztaccihuatl y Popocatepetl, distribuidos en las sierras del Ajusco, Chichinautzin y Nevada.

**Figura 12.** Distribución de los grupos de las poblaciones del conejo zacatucho (*Romerolagus diazi*), basado en la red de haplotipos.

**Figura 3.** Árbol de Neighbor-joining de las secuencias de la región control del conejo zacatucho (*Romerolagus diazi*), utilizando valores de distancia genética de Kimura-2-parámetros. Los números en los nodos muestran los valores de Bootstrap > 50%.

**Figura 4.** Árbol de consenso de las secuencias de la región control, derivado del análisis de parsimonia basado en una búsqueda heurística con 10 adiciones al azar y el algoritmo de TBR empleando secuencias de la región control del conejo zacatucho (*Romerolagus diazi*). Se obtuvieron 3 árboles igualmente parsimoniosos, con una longitud ( $L = 132$ ), índice de consistencia ( $CI = 0.721$ ) e índice de retención ( $RI = 0.869$ ). Los valores de Bootstrap > 50% se muestran en las ramas.

**Figura 5.** Red de haplotipos que muestra las relaciones observadas entre los grupos de obtenidos a partir de las secuencias de la región control del conejo zacatucho de la zona Ajusco Chichinautzin. Las líneas que cruzan las ramas indican el número de nucleótidos en las que difieren con relación a los distintos grupos.

## CONCLUSIONES GENERALES

Las especies de lagomorfos mexicanos contienen información muy valiosa con respecto a la historia evolutiva que podría arrojar información muy importante con respecto a los acontecimientos históricos geográficos que han moldeado de manera tan extraordinaria las condiciones geográficas del territorio mexicano.

En el presente trabajo, el empleo de herramientas genéticas a nivel específico, ha probado su efectividad, logrado hacer una contribución al conocimiento de la historia evolutiva de las especies de liebres mexicanas. Se pudo determinar que a diferencia de las especies de lagomorfos que habitan otros países, las especies mexicanas conforman un linaje monofilético, con una historia antigua que ha permitido diversificar el número de especies continentales e insulares. Se han aportado argumentos a favor de un origen americano de las liebres, apoyando el surgimiento en primera instancia de un organismo ancestro de *Lepus americanus*, el cual se expande hacia el sur para dar lugar a las especies mexicanas y hacia el norte y luego al resto del mundo a través de Asia para diversificarse en todas las especies de liebres que existen en la actualidad. Se ha observado el complejo sistema que conforman las especies con distribución circumpolar y las consecuencias taxonómicas que refieren.



Sin embargo, hace falta todavía mucho por conocer sobre la historia evolutiva, especialmente del género *Sylvilagus*, que sin duda completaría la visión de la genealogía de lepóridos incluyendo aquellos que habitan en territorio mexicano.

A nivel intraespecífico, esta herramienta ha resultado también eficaz, empleando un marcador más variable. La información generada para las poblaciones del conejo zacatuche ha permitido cuantificar el efecto que ha provocado la alteración del ambiente en el hábitat de esta especie, tanto por los eventos climáticos ocurridos en la antigüedad como los recientes intensificados por las actividades humanas. Se ha podido documentar la poca variación genética que presentan las poblaciones de esta especie, a la vez de la posible existencia de un cuello de botella o algún evento similar que mantiene a las poblaciones actuales con una variabilidad estable, pero con muy escaso flujo génico.

Es de gran importancia para la conservación, conocer cual es el estado de salud genética que guardan los organismos de las poblaciones de esta especie. De los resultados obtenidos, se puede destacar el importante papel que juega la imposición de barreras tan efectivas como la construcción de carreteras en la dinámica poblacional de una especie. Se puede apreciar que en la zona del Ajusco, las poblaciones del conejo zacatuche han tenido un mayor flujo, permitiendo el movimiento de organismos y de genes entre el fraccionado hábitat esta región, esta situación tiene como consecuencia linajes similares



entre si que comparten las características de variabilidad genética. Por otro lado, en el Chichinautzin se tienen poblaciones estructuradas, que muestran un grado de diferenciación ligeramente más elevado y en el cual aunque se tiene un menor número de haplotipos, existe una mayor diversidad haplotípica. Esta información, en conjunto con estudios demográficos y robustecido por más estudios genéticos empleando tanto un mayor tamaño de muestra como genes nucleares podría ser empleada para tomar decisiones acerca de la conservación de esta especie.